

Université de Sherbrooke

**IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX9  
DANS LA RÉGULATION DU GÈNE DE LA FURINE LORS DE  
LA DIFFÉRENCIATION DE LA LIGNÉE CHONDROCYTAIRE  
ATDC5**

Par

Philippe Guimont  
Département de pédiatrie  
Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Science (M.Sc.) en immunologie  
2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-31399-2*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-31399-2*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

# **TABLE DES MATIÈRES**

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b> | <b>II</b> |
|---------------------------|-----------|

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> | <b>IV</b> |
|--------------------------------------|-----------|

|  |          |
|--|----------|
| <b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS UTILISÉES</b> | <b>V</b> |
|--|----------|

## **RÉSUMÉ**

|                        |          |
|------------------------|----------|
| <b>1. INTRODUCTION</b> | <b>1</b> |
|------------------------|----------|

|   |          |
|---|----------|
| <b>1.1 L'ossification endochondrale</b> | <b>2</b> |
|---|----------|

|  |          |
|--|----------|
| <b>1.2 Les facteurs de transcription impliqués dans l'ossification endochondrale</b> | <b>4</b> |
|--|----------|

|   |   |
|---|---|
| 1.2.1 La superfamille des protéines Sox | 5 |
|---|---|

|             |    |
|-------------|----|
| 1.2.2 STAT1 | 16 |
|-------------|----|

|            |    |
|------------|----|
| 1.2.3 NFAT | 16 |
|------------|----|

|             |    |
|-------------|----|
| 1.2.4 CbFa1 | 17 |
|-------------|----|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.3 Les convertases à proprotéine de type subtilisine</b> | <b>17</b> |
|--|-----------|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1.3.1 La découverte des SPCs | 17 |
|------------------------------|----|

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 1.3.2 Structure des SPCs | 21 |
|--------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| 1.3.3 Localisation tissulaire et substrats des SPCs | 26 |
|---|----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1.3.4 Inhibiteurs des SPCs | 29 |
|----------------------------|----|

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 1.3.5 Pathologies et SPCs | 31 |
|---------------------------|----|

|   |               |
|---|---------------|
| <b>1.4 La furine et l'ossification endochondrale</b>                | <b>33</b>     |
| 1.4.1 Le TGF- $\beta$ 1   | 34            |
| 1.4.2 Le BMP-4  | 35            |
| 1.4.3 Le PTHrP  | 36            |
| 1.4.4 Le CHM-1  | 38            |
| <b>1.5 L'ostéoarthrite en tant que pathologie type du cartilage</b> | <b>39</b>     |
| <b>1.6 Pertinence et objectifs de recherche</b>                     | <b>41</b>     |
| <br><b>2. PUBLICATION</b>   | <br><b>43</b> |
| <br><b>3. DISCUSSION</b>  | <br><b>80</b> |
| <br><b>4. CONCLUSION</b>  | <br><b>93</b> |
| <br><b>5. REMERCIEMENTS</b>   | <br><b>96</b> |
| <br><b>6. RÉFÉRENCES</b>  | <br><b>97</b> |

## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

|                         |   |           |
|-------------------------|---|-----------|
| <b><u>FIGURE 1</u></b>  | La chondrogenèse lors de l'ossification   | <b>3</b>  |
| <b><u>FIGURE 2</u></b>  | Modélisation du site de liaison à l'ADN de type HMG                                   | <b>9</b>  |
| <b><u>FIGURE 3</u></b>  | Éléments architecturaux présents dans le domaine de liaison à l'ADN de type HMG       | <b>11</b> |
| <b><u>FIGURE 4</u></b>  | Les membres de la famille des convertases à proprotéines de type Kex2/subtilisine     | <b>20</b> |
| <b><u>TABLEAU 1</u></b> | Sommaire de l'expression et de la fonction biologique des protéines SOX               | <b>6</b>  |
| <b><u>TABLEAU 2</u></b> | Précurseurs protéiques maturés par les convertases à proprotéines de type subtilisine | <b>23</b> |

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS UTILISÉES

|                  |   |
|------------------|---|
| ADAM :           | <i><u>A</u> <u>d</u>isintegrin <u>a</u>nd <u>m</u>etalloprotease</i>                  |
| ADN :            | <i><u>A</u>cide <u>d</u>ésoxyribo<u>n</u>ucléique</i>                                 |
| Agc :            | <i>Aggrécan</i>   |
| ARNm :           | <i><u>A</u>cide <u>r</u>ibo<u>n</u>ucléique <u>m</u>essenger</i>                      |
| $\alpha_1$ -AT : | <i><math>\alpha_1</math>-antitrypsine</i>   |
| $\alpha_2$ M :   | <i><math>\alpha_2</math> macroglobuline</i>   |
| BMP :            | <i><u>B</u>one <u>m</u>orphogenetic <u>p</u>rotein</i>                                |
| Cbfa1 :          | <i><u>C</u>ore <u>b</u>inding factor <u><math>\alpha</math>1</u></i>                  |
| CMH :            | <i>Complexe <u>m</u>ajeur d'<u>h</u>istocompatibilité</i>                             |
| DFP :            | <i>Dynorphine</i>   |
| EDTA :           | <i>Acide éthylènediamine-tétraacétique</i>  |
| EMSA :           | <i><u>E</u>lectrophoretic <u>m</u>obility <u>s</u>hift <u>a</u>ssays</i>              |
| FGF :            | <i><u>F</u>ibroblast growth factors</i>   |
| HMG :            | <i><u>H</u>igh-<u>m</u>obility group</i>  |
| IL-1 :           | <i>Interleukine-1</i>   |
| LZ :             | <i><u>L</u>eucine zipper</i>  |
| MEC :            | <i><u>M</u>atrice <u>e</u>xtracellulaire</i>  |
| MMP :            | <i><u>M</u>atrix <u>m</u>etalloprotease</i>   |
| MT-MMP :         | <i><u>M</u>embrane-type <u>m</u>atrix <u>m</u>etalloprotease</i>                      |
| NFAT :           | <i><u>N</u>uclear factor of <u>a</u>ctivated <u>T</u> cells</i>                       |
| PACE :           | <i><u>P</u>aired <u>a</u>mino acid <u>c</u>leaving <u>e</u>nzyme</i>                  |
| PCR :            | <i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>                                 |
| PMSF :           | <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>  |
| PPR :            | <i><u>P</u>arathyroid hormone related <u>p</u>eptide <u>r</u>eceptor</i>              |
| PQA :            | <i><u>P</u>roline-glutamine-<u>a</u>lanine</i>  |
| PTH :            | <i><u>P</u>arathyroid <u>h</u>ormone</i>  |
| PTHrP :          | <i><u>P</u>arathyroid <u>h</u>ormone related <u>p</u>eptide</i>                       |
| RE :             | <i>Réticulum endoplasmique</i>  |
| Sox :            | <i><u>S</u>ry-type <u>H</u>MG <u>b</u>ox</i>  |
| SPC :            | <i><u>S</u>ubtilisin-like <u>p</u>roprotein <u>c</u>onvertase</i>                     |
| SPQ :            | <i>Sérine-proline-glutamine</i>   |
| Sry :            | <i><u>S</u>ex determining <u>r</u>egion of chromosome <u>Y</u></i>                    |
| STAT :           | <i><u>S</u>ignal <u>t</u>ransducers and <u>a</u>ctivators of <u>t</u>ranscription</i> |
| TGF :            | <i><u>T</u>ransforming growth factor</i>  |
| TGN :            | <i><u>T</u>rans-<u>G</u>olgi <u>n</u>etwork</i>                                       |
| VEGF :           | <i><u>V</u>ascular <u>e</u>ndothelial growth factor</i>                               |

## Résumé

La convertase à proprotéine furine est exprimée de façon ubiquiste chez les vertébrés. Elle est impliquée dans la maturation d'un éventail très large de substrats dont certains jouent un rôle de premier plan dans le processus de chondrogenèse. Dans le but de déterminer l'implication de la furine dans ce processus, nous avons utilisé la lignée cellulaire préchondrocytaire ATDC5. Il s'agit d'un modèle établi de différenciation chondrocytaire *in vitro*. Des essais de différenciation de la lignée cellulaire ATDC5 ont permis d'observer une augmentation dans les niveaux d'expression d'ARNm de la furine parallèlement aux niveaux d'ARNm du collagène de type II et de Sox9. Ce dernier est un facteur de transcription essentiel pour la formation de cartilage et qui porte un motif de liaison à l'ADN de type HMG. Les essais de transfections transitoires effectués avec un plasmide contenant la région codante de la protéine Sox9 ont démontré que cette dernière avait la capacité d'augmenter les niveaux d'ARNm de la furine via son promoteur P1A. Notre étude de délétion en 5' de ce promoteur nous a permis de déterminer que la région -2096/-1563 était nécessaire à la réponse à Sox9. Par gel de rétention, il a été possible de démontrer que l'action directe de Sox9 sur le promoteur P1A était limitée à deux sites de reconnaissance Sox soit 5' CATTGTT 3' et 5' CAGTTTC 3' nommé respectivement site A et B. L'action de Sox9 sur le gène de la furine est inhibée par L-Sox5 et Sox6, deux facteurs de transcription homologues impliqués dans la différenciation des chondrocytes. L'effet inhibiteur de Sox6 est levé lorsqu'une

version mutée, exempte du domaine de liaison à l'ADN de type HMG fonctionnel, est utilisée. Ceci suggère que l'effet répressif de Sox6 est médié par sa liaison au site de reconnaissance sur l'ADN. Ensemble, ces résultats nous indiquent que Sox9 régule l'expression de la furine lors de la chondrogenèse. De plus, ils suggèrent que Sox6, via sa boîte HMG, joue un rôle de régulateur négatif dans ce phénomène.



## **1. Introduction**

Chez l'humain, le squelette est tout d'abord formé sous forme de « charpente » cartilagineuse qui n'est ni plus ni moins qu'une ébauche du squelette en devenir. Cette ébauche cartilagineuse est formée par les chondrocytes, cellules spécialisées dans la production et le maintien du cartilage. Ces mêmes cellules vont passer par une série d'étapes programmées de différenciation. L'étape d'hypertrophie représente le phénotype terminal des chondrocytes et le cartilage formé précédemment est alors transformé en os sous l'action des ostéoblastes. Alors que la majorité du cartilage est remplacée par l'os, une zone de cartilage est conservée à la surface des articulations.

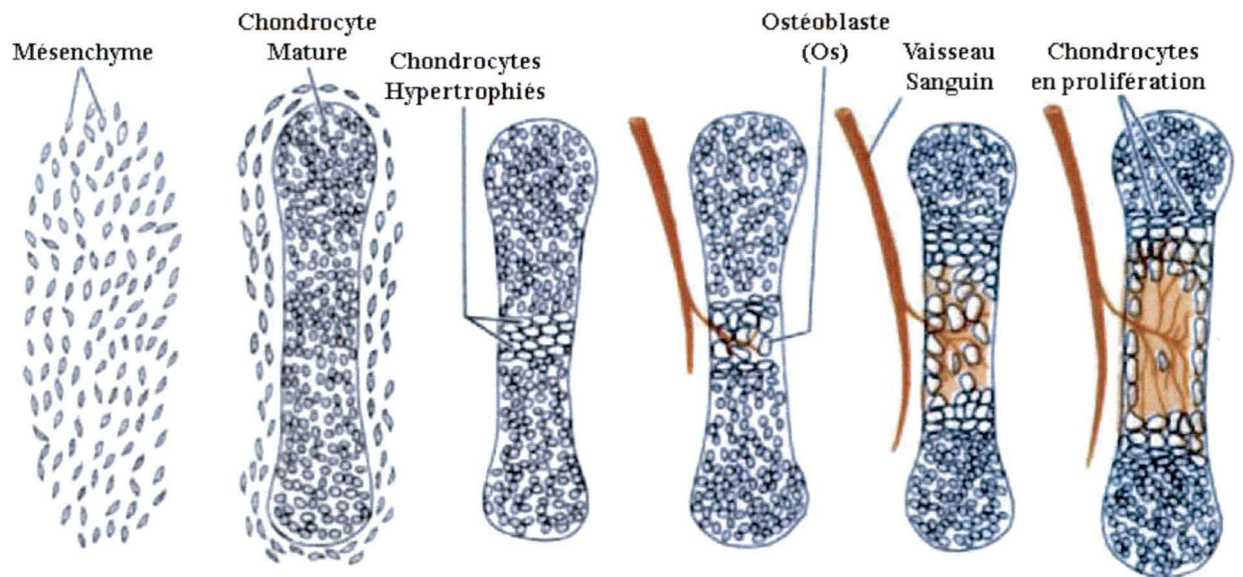
La persistance de cartilage à la surface des articulations, le cartilage articulaire, est nécessaire pour une bonne fonction des articulations. L'ostéoarthrite est une maladie non-inflammatoire des articulations caractérisée par la dégénération du cartilage articulaire. Malgré de nombreuses recherches, l'ostéoarthrite demeure toujours incurable. Par contre, suite aux résultats obtenus par différentes équipes de recherche, il est possible aujourd'hui d'élaborer différentes hypothèses pouvant expliquer la pathogenèse de l'ostéoarthrite. Un survol de la littérature ainsi que les résultats de nos recherches antérieures nous laissent croire que plusieurs joueurs importants dans le maintien des fonctions du cartilage articulaire seraient tous interreliés par l'action d'une convertase à proprotéines de type subtilisine, la furine.

## 1.1 L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est un des deux processus menant à la formation d'os chez les vertébrés. La majorité des os longs sont formés lors de ce processus qui se déroule en deux phases pendant lesquelles les chondrocytes passeront par une série d'étapes de différenciation (DE CROMBRUGGHE *et al.*, 2001 ; ARCHER *et al.*, 2003 ; SHUM et NUCKOLLS, 2002). La première phase permet la formation de matrice cartilagineuse (figure 1) . Elle débute lors de la condensation des cellules du mésenchyme qui vont se différencier et donneront naissance aux chondrocytes, cellules productrices de cartilage. À cette étape, les chondrocytes expriment des marqueurs cellulaires et moléculaires typiques, par exemple le collagène de type II, type IX, type XI, l'aggrécane ainsi que le facteur de transcription Sox9 (DE CROMBRUGGHE *et al.*, 2001 ; YANG et KARSENTY, 2002) . Ces marqueurs permettent de différencier les sous-populations de chondrocytes à des étapes de différenciation variées. La division cellulaire active caractéristique se fait de façon longitudinale et alignée. C'est à cette étape que la charpente squelettique cartilagineuse est formée. Cette charpente fournit un support structurel pour l'embryon, forme une base pour les os issus de l'ossification endochondrale et permet une zone de croissance des os postnataux. De plus, le cartilage offre une surface résistante à l'abrasion et à la compression dans les articulations ainsi que les éléments structurels flexibles du visage. La réparation des os lors de fractures est également initiée par une production de cartilage.

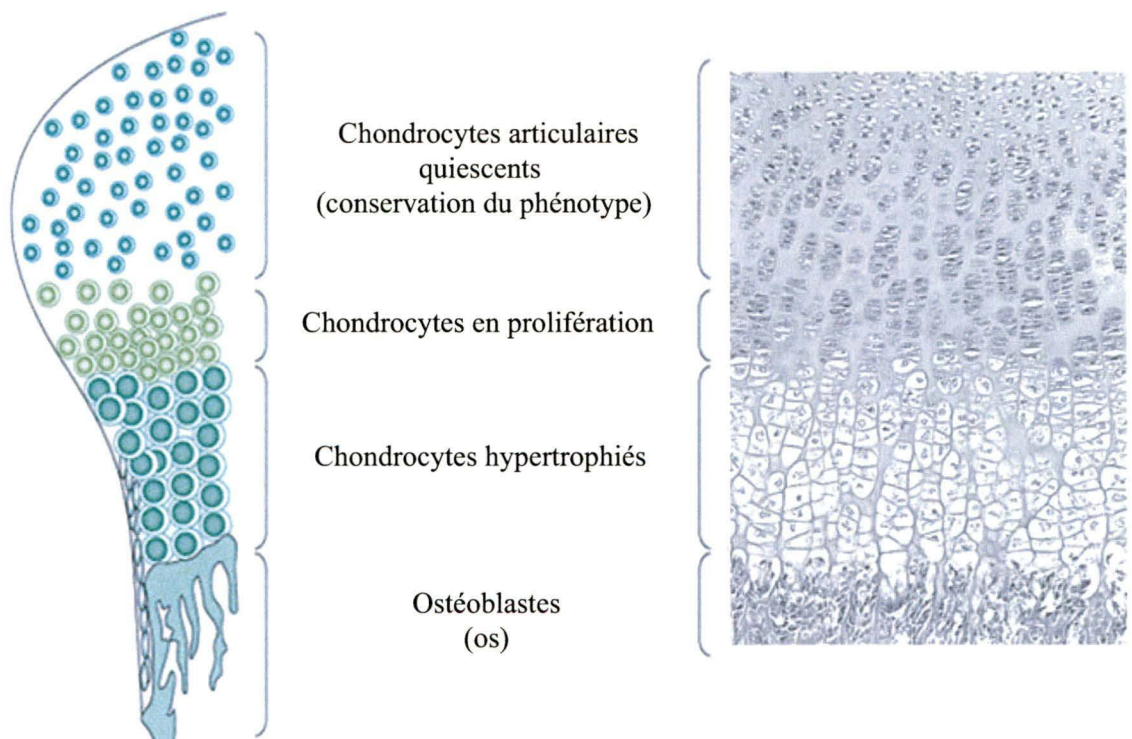
**FIGURE 1 : La chondrogenèse lors de l'ossification endochondrale.** A) Représentation schématique de l'ossification endochondrale ainsi que des chondrocytes à différentes étapes de maturation. B) Représentation schématique et histologique d'un os issu de l'ossification endochondrale.

**A**



tiré du site internet : <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci312/Bone/Bonelect.htm>.

**B**



Adapté de Yang, 2001

La maturation et la différenciation des chondrocytes vont se poursuivre et ils deviendront hypertrophiques. Leur morphologie passera de petites à grosses cellules et la division cellulaire s'arrêtera. L'expression des marqueurs qui étaient spécifiques à la première étape sera remplacée par le collagène de type X, la phosphatase alcaline ainsi que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). À cette étape, la matrice extracellulaire (MEC) deviendra progressivement calcifiée et sous l'action du VEGF, des vaisseaux sanguins envahiront le cartilage hypertrophique (YANG et KARSENTY, 2002; SCHIPANI et PROVOT, 2003). La formation de vaisseaux sanguins permettra la migration d'ostéoprogéniteurs aux sites d'ossification primaires et le début de la seconde phase de l'ossification endochondrale : l'ostéogenèse. Les ostéoprogéniteurs s'implanteront dans les sites d'ossification primaires et se différencieront en ostéoblastes, cellules productrices d'os. Les ostéoblastes remplaceront la matrice extracellulaire cartilagineuse par une matrice extracellulaire osseuse. Un os long et sain typique conservera seulement deux zones de cartilage : une zone dite de croissance qui permettra la croissance de l'os et une zone de cartilage articulaire à la surface des articulations qui conférera les caractéristiques de résistance aux chocs et à la friction.

## **1.2 Les facteurs de transcription impliqués dans l'ossification endochondrale**

Le cartilage est un tissu complexe contenant une variété unique de molécules qui confèrent au cartilage la capacité de résistance à la pression et à l'abrasion associée aux articulations. Le chondrocyte est responsable de l'expression coordonnée de différentes molécules composant ce cartilage, par exemple les multiples types de

collagène (type II, IX, X, XI) et les protéoglycans (aggrécan, biglycan, decorin, chondradherin, fibromodulin) (KNUDSON et KNUDSON, 2001). De façon à assurer une composition quantitativement et qualitativement précise durant la formation du cartilage et d'en maintenir l'intégrité, le chondrocyte doit assurer une expression synchronisée des différentes molécules extracellulaires tant au niveau de la synthèse que de la dégradation.

### **1.2.1 La superfamille des protéines Sox**

Le contrôle de l'expression des différentes molécules impliquées dans l'ossification endochondrale se fait, en partie, au niveau de l'activation des gènes qui leur sont associés. Plusieurs études ont porté sur l'identification du ou des facteurs de transcriptions essentiels qui contrôleraient l'activation des gènes nécessaires à la différenciation des chondrocytes. Ces recherches ont permis de mettre en évidence le rôle primordial joué par certains membres de la famille de facteurs de transcription Sox (Sry-type HMG box). Ces derniers forment une famille de protéines ayant un motif de liaison à l'ADN qui joue un rôle critique dans plusieurs événements lors du développement incluant la détermination du sexe mâle chez l'homme (VIDAL *et al.*, 2001 ; GASCA *et al.*, 2002), le développement du système nerveux (KUHNBRODT *et al.*, 1998 ; SOUTHARD-SMITH *et al.*, 1998) et la formation du squelette chez les vertébrés (LEFEBVRE *et al.*, 1997 ; NG *et al.*, 1997 ; BELL *et al.*, 1997) (tableau 1).

**TABLEAU 1 : Sommaire de l'expression et de la fonction biologique des protéines SOX.** Adapté de Wegner, 1999.

| Groupe | Facteur   | Expression   | Fonction   |
|--------|---|--|--|
| A      | SRY   | mâle-spécifique<br>testicules adultes, hypothalamus  | Détermination des testicules<br><i>Mutation chez l'humain cause<br/>« XY sex reversal » et dysgenèse<br/>des gonades</i>   |
| B      | Sox1<br>Sox2<br>Sox3<br>Sox21                                 | CNS embryonnaire, cristallin, région<br>urogénitale<br>Ectoderme primitif, CNS en<br>développement, cristallin<br><br>Epiblaste, CNS embryonnaire<br><br>Ectoderme primitif, endoderme,<br>développement de l'intestin, CNS<br>embryonnaire  | Induction et maintien de<br>l'expression du gène $\gamma$ -cristallin<br>Activation de l'expression de<br>FGF-4, et répression<br>d'ostéopontine. Induction de<br>l'expression des gènes $\delta$ et $\gamma$ -<br>cristallin<br>Gène candidat pour le syndrome<br>de retard mental lié au X |
| C      | Sox4<br>Sox11<br>Sox22<br>Sox24                               | Cœur embryonnaire, CNS en<br>développement, poumon, dent, gonades,<br>thymus, cellules pré-B et T<br>CNS et CNP en développement, rein,<br>poumon<br>CNS et CNP embryonnaire, cœur, reins,<br>pancréas, gonades<br>oocytes   | Développement du cœur,<br>développement des cellules B<br><br>Détermination et différenciation<br>du système nerveux<br>Détermination et différenciation<br>du système nerveux   |
| D      | Sox5<br>L-Sox5<br><br>Sox6<br><br>Sox12<br>Sox13<br><br>Sox23 | Testicules adultes<br>Condensation des cellules du<br>mésenchyme, chondrocytes, CNS<br>embryonnaire<br><br>CNS embryonnaire, cellules du<br>mésenchyme en condensation,<br>chondrocytes, testicules adultes<br>Ovaires<br>Embryon : oreille interne, parois<br>artérielles, thymus<br>Adultes : thymus, ovaires, reins<br>Cerveau, ovaires, foie | Spermatogenèse<br>Chondrogenèse<br><br>Chondrogenèse   |
| E      | SoxP1<br>Sox9<br><br>Sox10                                    | Pituitaire, gonades<br>Cellules ventriculaires du CNS, cellules<br>du mésenchyme en condensation,<br>chondrocytes, testicules adultes<br><br>CNS et CNP embryonnaire, cellules de<br>Schwann, oligodendrocytes   | Chondrogenèse, expression du<br>gène Col2a1 et aggrécane,<br>détermination du sexe mâle,<br>facteur de différenciation des<br>cellules de Sertoli  |
| F      | Sox7<br>Sox17<br>Sox18  | Gonades, reins, poumons, cerveau<br>Testicules<br>Poumons, muscle cardiaque et<br>squelettique   |  |
| G      | Sox20<br>SoxD   | Testicules fœtaux<br>CNS en développement  |  |



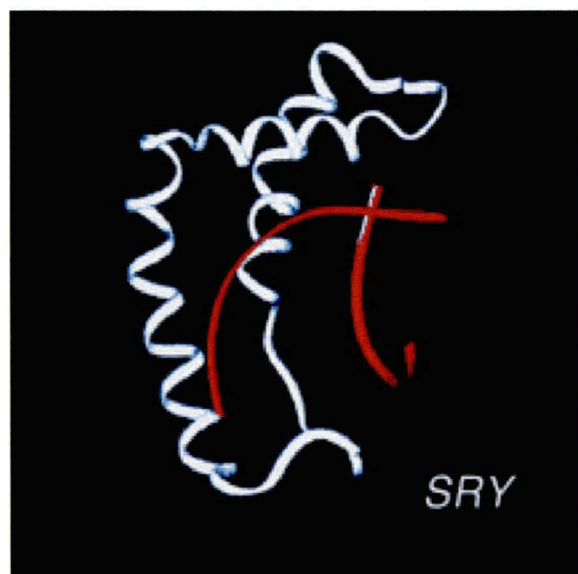
La première protéine Sox identifiée est le facteur Sry qui détermine le sexe mâle chez l'humain et la souris (SINCLAIR *et al.*, 1990 ; GUBBAY *et al.*, 1990). Sry porte un motif de liaison à l'ADN similaire à celui de HMG-1 et 2, deux protéines non-histones retrouvées en abondance dans les chromosomes. Ce domaine de liaison à l'ADN, nommé HMG (high-mobility-group), est présent dans les protéines formant la superfamille HMG box. Certains résidus de ce motif particulier, composé de 70 à 80 acides aminés, sont hautement conservés au sein de la superfamille même si la séquence générale peut être très divergente (LAUDET *et al.*, 1993). Par contre, une forte homologie est présente dans la séquence des différents membres des sous-groupes de la superfamille. Un de ces sous-groupes est la famille des Sox. Pour en faire partie, les membres doivent avoir une homologie d'au moins 50 % avec la séquence du domaine HMG de Sry qui est aussi connue sous Sry box, d'où provient le nom Sox. La présence du motif HMG octroie aux protéines qui le portent, la capacité de lier l'ADN de façon séquence spécifique (LAUDET *et al.*, 1993). La séquence d'ADN consensus, reconnue par les protéines Sox, a été définie comme étant 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (MERTIN *et al.*, 1999 ; HARLEY *et al.*, 1994). Bien que la famille des Sox soit composée d'une vingtaine de membres, il semble que tous reconnaissent la même séquence heptamérique d'ADN (MERTIN *et al.*, 1999 ; HARLEY *et al.*, 1994). De là provient le mystère des Sox, puisqu'il est difficile d'imaginer une famille de facteurs de transcription ayant tous la même séquence consensus, mais chacun étant impliqué dans plusieurs événements biologiques bien distincts. Une certaine sélectivité peut être expliquée par l'expression spécifique aux tissus (PEVNY *et al.*, 1997) ou par l'interaction avec

d'autres protéines (HARLEY *et al.*, 1996 ; AMBROSETTI *et al.*, 1997 ; POULAT *et al.*, 1997 ; DE SANTA BARBARA *et al.*, 1998 ; OWEN *et al.*, 2001 ; TSUDA *et al.*, 2003). Suite à une étude d'affinités avec des oligonucléotides dégénérés, un groupe a conclu qu'en plus de la séquence heptamérique, les nucléotides présents aux extrémités 3' et 5' étaient importants et sensiblement différents pour Sox9 et SRY (MERTIN *et al.*, 1999). Toutefois, aucun groupe n'a encore fait d'analyse complète pour l'ensemble des Sox. Comme toutes protéines qui portent un ou plusieurs motifs HMG, les Sox ont aussi la capacité de reconnaître certaines structures ou motifs d'ADN n'ayant pas de séquence de reconnaissance (FERRARI *et al.*, 1992 ; PETERS *et al.*, 1995 ; VRIZ *et al.*, 1995 ; TRIMMER *et al.*, 1998). Par contre, il n'est toujours pas connu si cette capacité est importante pour la fonction des Sox *in vivo*.

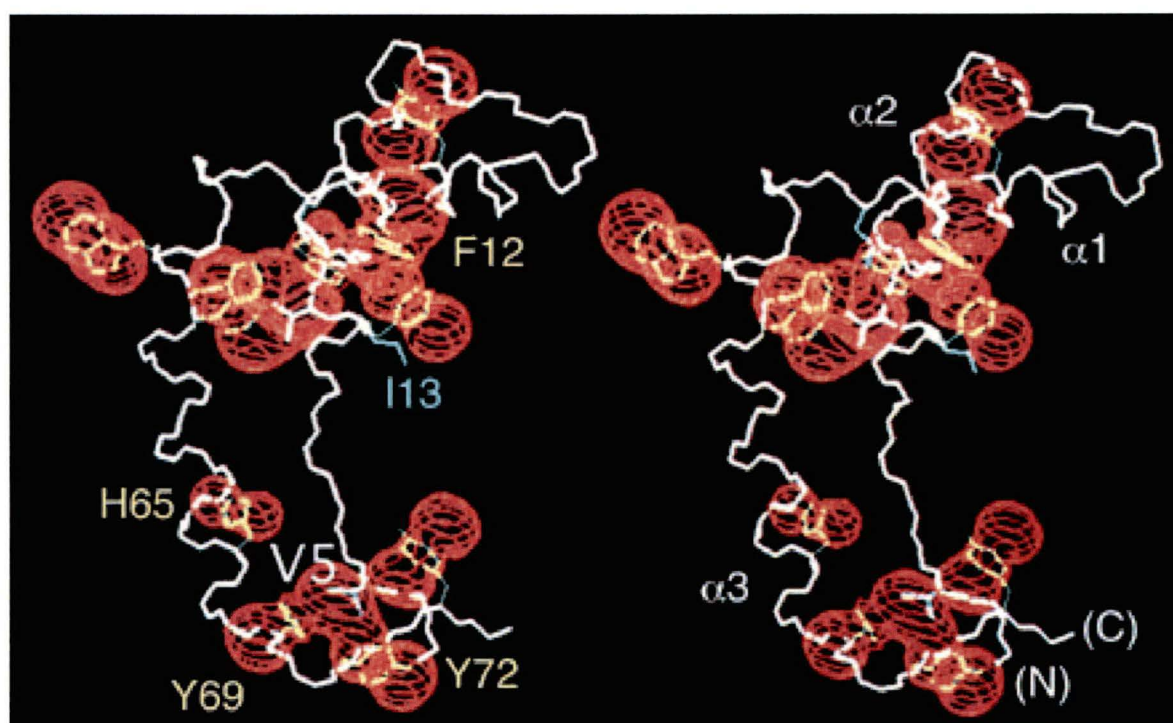
La liaison d'une protéine Sox au site de reconnaissance induit un changement de conformation de l'ADN. Pendant que la majorité des facteurs de transcription lient l'ADN dans le sillon majeur, les Sox s'inséreront dans le sillon mineur (FERRARI *et al.*, 1992 ; CONNOR *et al.*, 1994 ; PONTIGGIA *et al.*, 1994). Cette liaison induira un angle de 70° – 85° dans la structure de l'ADN. La capacité caractéristique des Sox à cibler le sillon mineur de l'ADN a fait naître l'hypothèse selon laquelle ces dernières auraient un rôle architectural dans la régulation des gènes cibles. À ce moment, le rôle, ou du moins une partie du rôle, joué par les protéines Sox en serait un d'organisation de la structure de la chromatine et d'assemblage des différents facteurs de

**FIGURE 2 : Modélisation du site de liaison à l'ADN de type HMG.** A) Modélisation de type bâtonnet du domaine HMG de la protéine SRY complexée à l'ADN. La protéine est représentée en blanc alors que la double hélice d'ADN est représentée en rouge. B) Simulation stéréoscopique des résidus aromatiques impliqués dans la liaison à l'ADN, présents au sein de la structure du motif HMG de la protéine SRY. Le squelette protéique et les résidus sélectionnés sont représentés en blanc alors que le champ magnétique des résidus est en rouge. Adapté de Weiss, 2001.

A



B



transcription liant l'ADN en un complexe multiprotéique biologiquement actif. De façon plus précise, la modification de la structure d'ADN permettrait le rapprochement de séquences de liaisons et par la même occasion les protéines qui y sont liées pour favoriser les interactions protéine-protéine (MARSHALL et HARLEY, 2000 ; WERNER et BURLEY, 1997 ; WOLFFE, 1994).

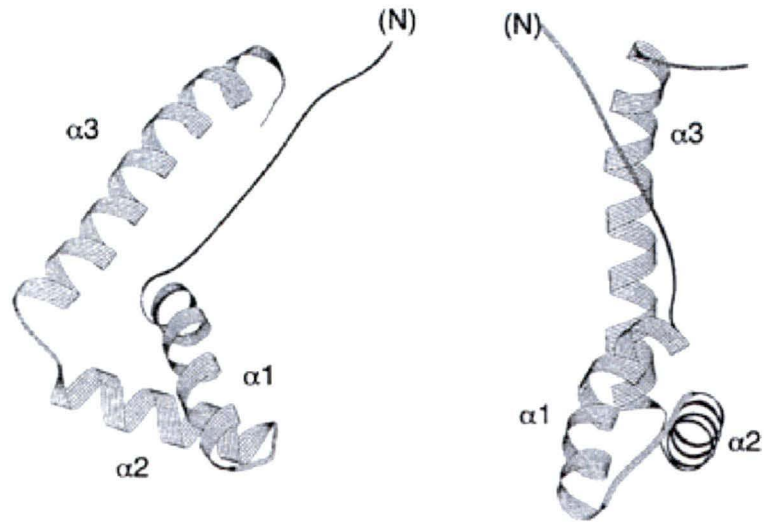
La structure du domaine HMG de la protéine Sry libre et liée à l'ADN a été résolue (VAN HOUTE *et al.*, 1995 ; WERNER *et al.*, 1995 ; WEISS, 2001) (figures 2 et 3). Cette structure est formée de trois hélices alpha (I à III) et d'un feuillet bêta en N-terminal, disposés de façon à former un L. Les hélices I et II s'associent de façon antiparallèle pour former le bras long tandis que l'hélice III et la portion N-terminale du domaine HMG s'associent pour former le bras court de la structure en L. Cette structure est maintenue grâce à un noyau hydrophobe constitué d'acides aminés qui sont hautement conservés chez les protéines ayant le domaine HMG. Il est à noter que, de ce fait, la structure adoptée par toutes les protéines ayant un motif HMG est relativement identique. Ces mêmes acides aminés forment le motif de base nécessaire à la reconnaissance et à la liaison de la séquence heptamérique d'ADN (WEGNER, 1999 ; HSIASO *et al.*, 2003). Les plus récentes observations sur la structure tertiaire des protéines de type HMG suggèrent que le bras court de la structure en L est instable en solution (WEISS, 2001). Il semble que ce soit seulement après liaison à l'ADN que la structure caractéristique est adoptée et stabilisée. De plus, il semblerait que le domaine HMG contiendrait, au sein même de sa séquence, deux signaux de localisation nucléaire (NLS) (SUDBECK et SCHERER, 1997 ; GASCA *et al.*, 2002).

**FIGURE 3 : Éléments architecturaux présents dans le domaine de liaison à l'ADN de type HMG.** A) Modélisation de type ruban de la structure généralement adoptée par les motifs de type HMG vue de face et de côté. L'hélice  $\alpha 1$  et 2 forment le bras long tandis que l'hélice  $\alpha 3$  et la portion N-terminale du domaine HMG forment le bras court. B) Modèle proposé du motif HMG en solution dans lequel le bras court existe en équilibre dans un ensemble de structure ouverte et fermée. Adapté de Weiss, 2001. C) Représentation schématisée de protéines de la famille des SOX. Adapté de Weiss, 2001 et Lefebvre, 2001.

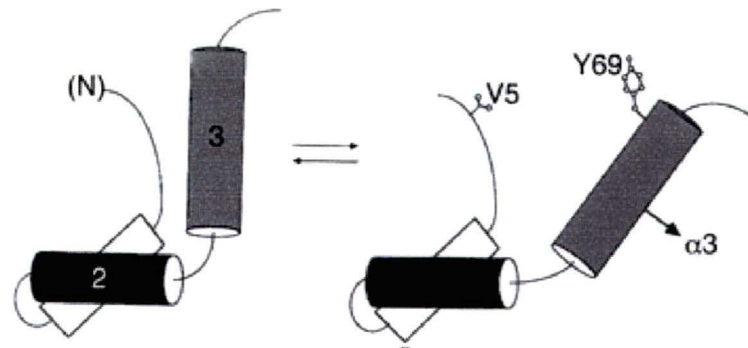
**A**

**Vue de face**

**Vue de côté**



**B**



**C**



motif leucine zipper

domaine de dimérisation

domaine riche en glutamine

domaine HMG

domaine de transactivation

La famille des protéines Sox est divisée en sous-groupe selon leur niveau d'homologie de séquence du domaine HMG, si bien que tous les membres d'un même sous-groupe partagent au moins 80 % d'homologie. Toutes les protéines Sox découvertes jusqu'à maintenant peuvent être classées dans l'un ou l'autre des 7 sous-groupes nommés de A à G (WEGNER, 1999). De la vingtaine identifiée, 3 ont un rôle reconnu lors de l'ossification endochondrale. L-Sox5 et Sox6 sont des facteurs de transcription ayant une très forte homologie l'un par rapport à l'autre en plus d'avoir des rôles essentiels mais redondants, dans la différenciation des chondrocytes (figure 3). Ceux-ci composent, avec Sox13, le sous-groupe D de la famille des Sox. Le gène *Sox5* code pour deux transcrits différents ayant des fonctions *in vivo* différentes. Le transcrit court, nommé Sox5, manque la portion N-terminale du transcrit long, nommé L-Sox5. D'autre part, le gène *Sox6* code lui aussi pour deux transcrits qui forment une seule et même protéine Sox6. Les motifs HMG de L-Sox5 et Sox6 sont homologues à plus de 90 % et sont localisés dans la portion C-terminale des protéines. Dans les deux cas, on retrouve dans cette même portion, un motif « leucine zipper » (LZ) séparé d'environ 250 acides aminés du HMG. Le motif LZ est suivi d'une région riche en glutamine avec laquelle il forme un domaine « coiled-coil ». Ce dernier permet l'homo- et l'hétérodimérisation entre Sox6 et L-Sox5 (LEFEBVRE *et al.*, 1998 ; YAMASHITA *et al.*, 1998 ; TAKAMATSU *et al.*, 1995). Contrairement au facteur de transcription bZip classique, la dimérisation ne mène pas à la création d'une nouvelle interface de liaison à l'ADN. L'influence du motif LZ semble être indirecte (groupe nominal invariable), en ce sens que la dimérisation diminue grandement l'affinité du dimère pour les sites de



reconnaissance consensus des monomères de Sox, mais augmente la capacité à reconnaître deux sites de reconnaissance adjacents (LEFEBVRE *et al.*, 1998). Le motif LZ permet aussi l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (YAMASHITA *et al.*, 1998).

Les patrons d'expression de L-Sox5 et de Sox6 se chevauchent rigoureusement l'un et l'autre (LEFEBVRE *et al.*, 1998). À ce jour, aucune mutation n'a été associée à une maladie chez la souris ou l'humain. Par contre, l'utilisation de souris mutantes pour les gènes *Sox5* et *Sox6* a permis de déterminer le rôle critique de ces gènes lors du développement (SMITS *et al.*, 2001). Les auteurs ont observé que les souris ayant les gènes *Sox5* et *Sox6* inactivés alternativement, souffraient de défauts squelettiques mineurs. Par contre, les souris ayant les deux gènes inactivés souffraient de chondrodysplasie généralisée, ressemblant aux cas les plus sévères de dysplasie squelettique décrits chez la souris et l'humain. L'analyse approfondie a révélé que le cartilage de telles souris était sévèrement déficient. Dans le processus de différenciation des chondrocytes, l'étape de condensation était normalement atteinte, mais la différenciation des préchondrocytes devenait dès lors sérieusement compromise. Selon les auteurs, la différenciation des chondrocytes était retardée à cause de leur incapacité à former une matrice extracellulaire abondante (SMITS *et al.*, 2001). Ainsi, L-Sox5 et Sox6 agissent à une étape précise lors de la différenciation des chondrocytes pour permettre aux cellules d'atteindre leurs fonctions de façon optimale. Ils sont cruciaux pour la formation d'une matrice cartilagineuse en assurant une différenciation cellulaire synchronisée entre l'état de

différenciation et la matrice cartilagineuse formée. Il est pertinent de mentionner que les chondrocytes ont des liens étroits avec leur environnement extracellulaire si bien que la composition de ce milieu peut modifier de façon importante le rythme de différenciation de ceux-ci.

Sox9 est membre du sous-groupe E. En plus du domaine HMG présent en N-terminal, il possède une région de transactivation en C-terminal composée d'une région riche en proline-glutamine-alanine (PQA). Une autre région riche en sérine-proline-glutamine (SPQ) augmente le potentiel de transactivation de cette dernière mais sans en avoir la capacité de façon intrinsèque (SUDEBECK *et al.*, 1996 ; MCDOWALL *et al.*, 1999). Le rôle essentiel joué par Sox9 dans la formation du squelette chez l'humain a été démontré avec l'identification de mutation dans le gène *Sox9*. Les patients atteints de dysplasie campomélique (MIM #114290) souffrent de malformations squelettiques sévères et la plupart du temps de réversion des sexes de mâle à femelle. Ce syndrome est généralement létal, mais une minorité de patients survit (FOSTER *et al.*, 1994 ; WAGNER *et al.*, 1994; KWOK *et al.*, 1995 ; BERNARD *et al.*, 2003).

Le groupe de BI *et al.* (1999) a illustré, de façon éloquente, que Sox9 joue un rôle essentiel dans la différenciation des chondrocytes et dans la formation du cartilage. Dans cette étude, les auteurs ont observé que les cellules Sox9<sup>-/-</sup> de souris chimères étaient exclues des zones cartilagineuses. Par contre, elles étaient présentes dans les zones périphériques, exemptes de marqueurs spécifiques des chondrocytes tel que les

collagènes Col2a1, le Col9a2, le Col11a2 et l'Agc. Il a été déterminé que cette exclusion avait lieu à l'étape de condensation lors de l'ossification endochondrale. D'autres études ont démontré que Sox9 régulait plusieurs gènes importants lors de la chondrogenèse, par exemple le Col2a1 (LEFEBVRE *et al.*, 1997 ; NG *et al.*, 1997), le Col9a1 (ZHANG *et al.*, 2003), le Col11a2 (BRIDGEWATER *et al.*, 1998; BRIDGEWATER *et al.*, 2003) et l'Agc (SEKIYA *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent que Sox9 régule plusieurs gènes spécifiques et caractéristiques des chondrocytes et que sans son expression, les chondroprogéniteurs ne deviennent jamais des chondrocytes matures.

Il a été démontré récemment que Sox9 avait la capacité de se dimériser tout comme Sox10, un autre membre du sous-groupe E. Un domaine de dimérisation a été identifié dans la région précédant immédiatement le domaine HMG de la protéine Sox9. Il semblerait que cette séquence soit commune à Sox8, Sox9 et Sox10, tous membres du même sous-groupe (SOCK *et al.*, 2003 ; BERNARD *et al.*, 2003 ; BRIDGEWATER *et al.*, 2003). La capacité de Sox9 à dimériser a une influence directe sur les gènes et les processus biologiques ciblés. Sous sa forme monomérique, les plus récentes études indiquent qu'il serait impliqué dans la détermination du sexe masculin. Par contre, sous sa forme dimérique, Sox9 jouerait plutôt un rôle déterminant dans la chondrogenèse (BERNARD *et al.*, 2003 ; SOCK *et al.*, 2003). Cette hypothèse se base sur la découverte d'un patient portant une mutation au domaine de dimérisation de Sox9. Ce patient souffrait de dysplasie campomélique mais, contrairement aux patients jusqu'ici répertoriés et atteints par cette maladie, il n'avait aucun symptôme de réversion de

sexe. Dans cette étude, les auteurs ont démontré de façon élégante que le mutant Sox9 conservait sa capacité à transactiver les gènes associés au phénotype sexuel au détriment de ceux associés à la chondrogenèse (BERNARD *et al.*, 2003).

### 1.2.2 Le STAT1

STAT1 est un facteur de transcription membre de la famille des *signal transducers and activators of transcription* (STAT) impliquée dans la cascade de signalisation des *fibroblast growth factors* (FGF). Chez l'humain, ce facteur de croissance est un régulateur négatif dans la croissance des os (GOLDFARB, 1996 ; WEBSTER et DONOGHUE, 1997; BURKE *et al.*, 1998). Une étude récente a démontré qu'avec des chondrocytes ainsi qu'avec des explants cartilagineux, l'effet inhibiteur du FGF dépendait de STAT1. L'effet inhibiteur observé n'était plus présent lorsque les mêmes expériences étaient effectuées à partir de cellules STAT1<sup>-/-</sup> (SAHNI *et al.*, 1999). STAT1 a donc un effet inhibiteur sur la prolifération des chondrocytes et fait partie d'un mécanisme homéostatique assurant le développement normal des os.

### 1.2.3 Le NFAT

Les *nuclear factor of activated T cells* (NFATs) sont un groupe de facteurs de transcription qui régule autant l'expression de plusieurs cytokines chez les lymphocytes que la formation des valves cardiaques (RANGER *et al.*, 1998). Une de ces protéines, NFAT1, régularise la chondrogenèse chez l'humain. En surexpression, il agit en tant que répresseur de la différenciation des chondrocytes *in vitro*. Les souris déficientes en NFAT1 souffrent de fusion des articulations, causée par une

formation ectopique spontanée du cartilage suivie d'une formation d'os récapitulant le processus d'ossification endochondrale (RANGER *et al.*, 2000).

#### **1.2.4 Le Cbfa1**

La protéine *core binding factor  $\alpha 1$*  (Cba1) ou Runx2 est le seul facteur de transcription à avoir la capacité d'induire l'hypertrophie des chondrocytes *in vivo* (UETA *et al.*, 2001 ; TAKEDA *et al.*, 2001). Au niveau du cartilage, l'expression de Cbfa1 est restreinte à la zone de chondrocytes pré-hypertrophiques. Les chondrocytes de souris qui en sont déficientes ont une hypertrophie retardée (ENOMOTO *et al.*, 2000). L'expression continue de Cbfa1 dans les chondrocytes non-hypertrophiques induit l'expression de collagène de type X, un marqueur spécifique du stade hypertrophique. Ces observations suggèrent que le facteur de transcription Cbfa1 est nécessaire à l'hypertrophie des chondrocytes.

### **1.3 Les convertases à proprotéine de type subtilisine**

#### **1.3.1 La découverte des SPCs**

Pour assurer leurs différentes fonctions, les cellules synthétisent une variété de protéines ayant chacune un rôle bien précis. Certaines protéines accompliront un rôle de messenger, d'autres serviront de transporteur ou auront simplement un rôle structurel. Historiquement, on a longtemps pensé que chaque protéine était issue d'un gène qui lui était propre. Grâce au séquençage du génome, on sait maintenant que

l'humain est composé d'environ 30000 gènes, pour une estimation de 10 à 100 millions de protéines. On sait qu'un gène peut générer une variété de protéines différentes. Un tel phénomène est possible entre autres, grâce à l'épissage alternatif, et aussi par la modification post-traductionnelle de protéines. Au cours des années 60, deux groupes ont émis l'hypothèse que les protéines étaient synthétisées sous forme de précurseurs intracellulaires et qu'elles étaient par la suite clivées de façon post-traductionnelle, pour rendre les protéines sous une forme mature et biologiquement active (CHRÉTIEN et LI, 1967 ; STEINER *et al.*, 1967). Quelques années plus tard, soit dans les années 80, la famille d'enzymes responsables de la maturation de plusieurs précurseurs peptidiques, les convertases à proprotéines, a été découverte. Par la suite, il a été démontré qu'essentiellement, toutes les hormones et neurotransmetteurs étaient synthétisés sous forme de précurseurs et clivés à des résidus dibasiques tels que RR, RK, KR ou KK (SEIDAH *et al.*, 1994).

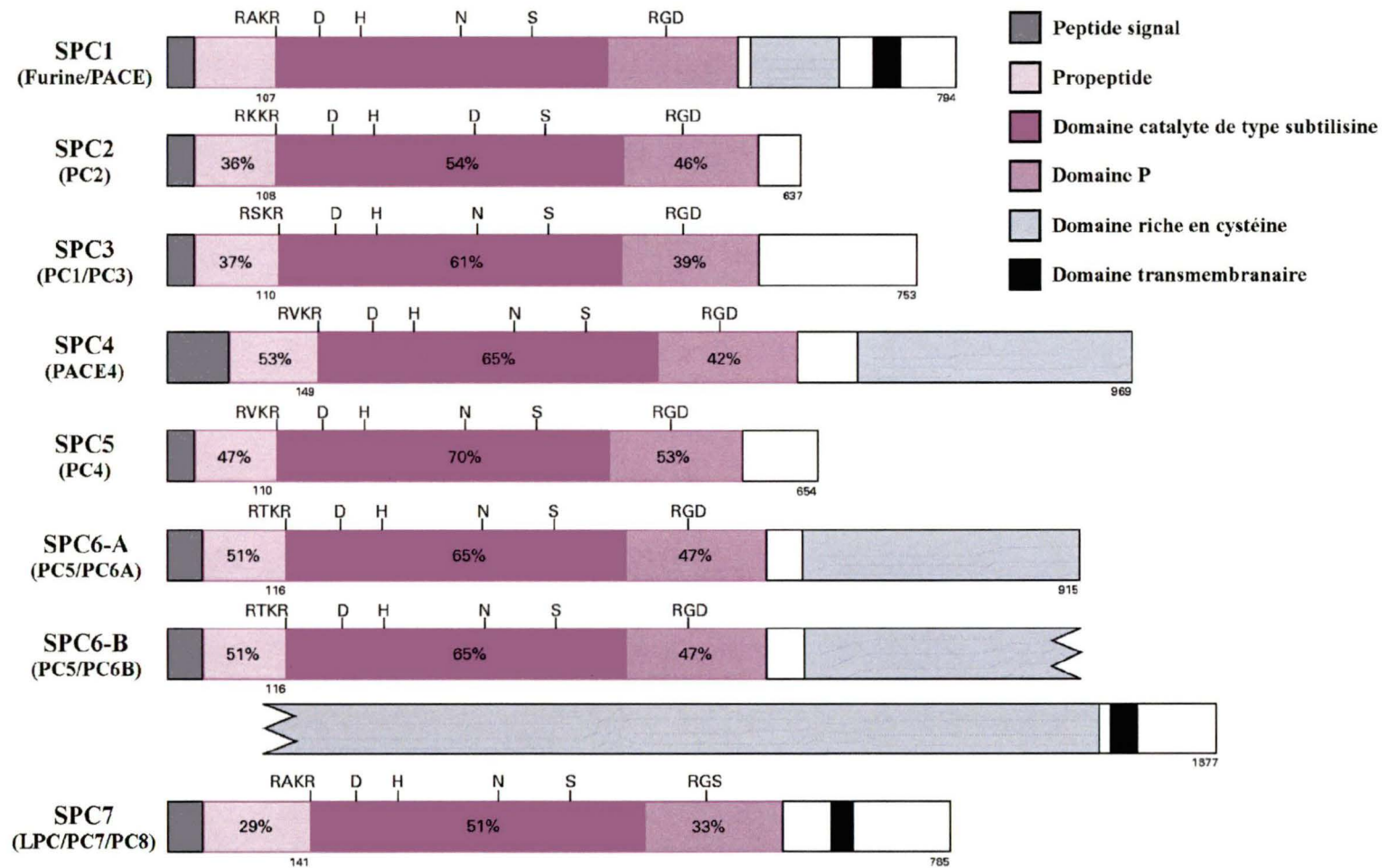
Les études menant à l'identification de la famille des convertases à proprotéines ont été menées sur la levure *S. cerevisiae*. Elles ont permis la découverte du gène *KEX2* aujourd'hui nommée kexine. Cette dernière fut la première convertase à proprotéine à être identifiée et clonée (JULIUS *et al.*, 1984 ; MIZUNO *et al.*, 1988). Il a été démontré chez la levure que cette enzyme catalyse le clivage du prepro- $\alpha$ -facteur aux résidus dibasiques lysine-arginine en C-terminal chez la levure (JULIUS *et al.*, 1984). Par la suite, d'autres substrats lui ont été attribués : chez les mammifères par exemple, la pro-albumine (BATHURST *et al.*, 1987), la pro-opiomélanocortine (POMC) (THOMAS *et al.*, 1988) et la protéine C (FOSTER *et al.*, 1991). La kexine

est inhibée par l'EDTA et l'EGTA alors que l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  lève cette inhibition (FULLER *et al.*, 1988 ; FULLER *et al.*, 1989). L'analyse de la séquence du gène *KEX2* a permis d'identifier une région N-terminale hautement homologue avec une protéase à sérine bactérienne de type *subtilisine-like* (MIZUNO *et al.*, 1988).

C'est en 1989 que la première convertase de mammifère a été décrite. En fait, c'est suite à l'analyse de la séquence d'une protéine clonée en 1986, ayant une haute homologie avec la kexine, que la convertase à proprotéine nommée furine a été identifiée. Cette protéine est le produit du gène *FUR* nommé ainsi à cause de sa localisation en aval du protooncogène *c-fes/fps* (*c-fes/fps* upstream region) situé sur le chromosome 15q25-q26.1 (ROEBROEK *et al.*, 1986a, 1986b ; SEIDAH *et al.*, 1991). Cette protéine partage une très haute homologie avec le domaine catalytique de la kexine, incluant les résidus importants pour l'activité catalytique. Cette découverte a été confirmée quelques années plus tard par deux groupes de recherches différents (VAN DEN OUWELAND *et al.*, 1990 ; BARR *et al.*, 1991), et le nom PACE (paired amino acid cleaving enzyme) a été proposé. L'activité de la furine, comme celle de la kexine, est dépendante du calcium et est active dans un large spectre de pH, mais son activité est maximale à pH 7.0 (HATSUZAWA *et al.*, 1992). Depuis, la famille des convertases à protéines s'est élargie et sept autres membres ont été identifiés grâce à l'utilisation du PCR avec des oligonucléotides dégénérés pour les séquences conservées du domaine catalytique de la furine et de la kexine (figure 4). Tout d'abord, il y a eu PC2 (proprotein convertase 2) et PC1 / PC3 (SMEEKENS et STEINER, 1990 ; SEIDAH *et al.*, 1990 ; SMEEKENS *et al.*, 1991 ;

**FIGURE 4 : Les membres de la famille des convertases à proprotéines de type kex2/subtilisine.** Le pourcentage d'homologie entre les domaines du propeptide, du domaine catalytique et du domaine P avec le prototype de la furine est donné pour chaque convertase. Les acides aminés essentiels à l'activité du domaine catalytique sont représentés. Adapté de Nakayama, 1997.





SMEEKENS *et al.*, 1991 ; SEIDAH *et al.*, 1991). En 1992, une nouvelle nomenclature simplifiée utilisant le terme SPC (subtilisin-like proprotein convertase) a été adoptée de façon à éviter la confusion créée avec l'appellation d'une même PC par deux noms différents (CHAN *et al.*, 1992) : ainsi, SPC1 (furine/PACE), SPC2 (PC2), SPC3 (PC1/PC3), SPC4 (PACE4) (KIEFER *et al.*, 1991), SPC5 (PC4) (NAKAYAMA *et al.*, 1992 ; SEIDAH *et al.*, 1992), SPC6 (PC5/PC6) (NAKAGAWA *et al.*, 1993a ; NAKAGAWA *et al.*, 1993b ; LUSSEN *et al.*, 1993 ; DE BIE *et al.*, 1996) et SPC7 (LPC/PC7/PC8) (MEERABUX *et al.*, 1996 ; BRUZZANITI *et al.*, 1996 ; SEIDAH *et al.*, 1996 ; CONSTAM *et al.*, 1996). Toutes ces convertases à proprotéines ont en commun la capacité de catalyser le clivage sélectif de leurs substrats au site de reconnaissance dibasique, permettant le relâchement de protéines biologiquement actives.

### **1.3.2 Structure**

Les convertases à proprotéines sont composées de plusieurs domaines distincts essentiels à leur fonction et/ou localisation (figure 4). Quatre sont retrouvées chez tous les PC. Il s'agit d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale, du prodomaine, du domaine catalytique de type subtilisine et du domaine P. De plus, certaines convertases possèdent un domaine riche en cystéines, d'autres, une région transmembranaire ou encore une queue cytosolique.

#### **La séquence signal et le prodomaine**

On retrouve à l'extrémité N-terminale, une séquence signal nécessaire pour que la proconvertase entre dans la voie de sécrétion cellulaire. Cette région est

immédiatement suivie par le prodomaine formé d'environ 80 à 90 acides aminés qui est terminé par un site de reconnaissance de type furine, soit R-X-K-R. Le prodomaine a de multiples fonctions. Ce domaine est d'abord clivé par un phénomène d'autoclivage intramoléculaire en C-terminal de la séquence consensus de type furine (LEDUC *et al.*, 1992 ; CREEMERS *et al.*, 1993 ; GOODMAN et GORMAN, 1994 ; MATTHEWS *et al.*, 1994). Suite au clivage, le prodomaine reste accolé de façon non covalente au site catalytique de la convertase mature et agit comme puissant autoinhibiteur. Ainsi, l'activité enzymatique est préservée et du même coup, la perte de la séquence signal permet la sortie de la protéine hors du réticulum endoplasmique (RE) puis son acheminement vers l'appareil de Golgi (TAKAHASHI *et al.*, 1995 ; MOLLOY *et al.*, 1994; CREEMERS *et al.*, 1995 ;ZHOU *et al.*, 1995). Dans l'environnement du trans-Golgi, sous l'effet du pH acide et de la haute concentration de calcium, il y a un deuxième clivage du prodomaine dans une seconde séquence de résidus basiques (ANDERSON *et al.*, 1997). Il a été démontré que le clivage du prodomaine est un prérequis, sans être suffisant pour le transport de la protéine au réticulum endoplasmique. Le prodomaine sert aussi de pseudochaperone puisqu'il assure un repliement correct de la convertase dans le RE (SEIDAH et CHRÉTIEN, 1997).

### **Domaine catalytique**

De tous les domaines composant les convertases à proprotéines, le domaine catalytique est celui dont l'homologie est la plus conservée entre les différentes PC.

**TABLEAU 2 : Précurseurs protéiques maturés par les convertases à proprotéines de type subtilisine.** Classification selon la fonction biologique des substrats. Le site de clivage ainsi que les résidus composant le motif de reconnaissance sont indiqués. Adapté de Seidah et Chrétien (1999) et de Molloy *et al.*, (1999).

| Catégories/Précurseurs     |                            | Position par rapport au site de clivage |    |    |    |    |    |   |     |     |
|----------------------------|----------------------------|---|----|----|----|----|----|---|-----|-----|
|                            |                            | P6                                      | P5 | P4 | P3 | P2 | P1 | ↓ | P1' | P2' |
| ProSPCs                    |                            |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
|                            | hproPC1                    | K                                       | E  | R  | S  | K  | R  |   | S   | A   |
|                            | hproPC2                    | F                                       | N  | R  | K  | K  | R  |   | G   | Y   |
|                            | hprofurine                 | K                                       | R  | R  | T  | K  | R  |   | D   | V   |
|                            | hproPC4                    | A                                       | R  | R  | V  | K  | R  |   | S   | L   |
|                            | hPACE4                     | K                                       | R  | R  | V  | K  | R  |   | Q   | V   |
|                            | hproPC5                    | K                                       | K  | R  | T  | K  | R  |   | N   | Y   |
|                            | hproPC7                    | L                                       | R  | R  | A  | K  | R  |   | S   | V   |
| Profacteurs de croissance  |                            |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
|                            | hproβNGF                   | T                                       | H  | R  | S  | K  | R  |   | S   | S   |
|                            | hproBDNF                   | S                                       | M  | R  | V  | R  | R  |   | H   | S   |
|                            | proBMP-1                   | R                                       | S  | R  | S  | R  | R  |   | A   | A   |
|                            | proBMP-4                   | R                                       | R  | R  | A  | K  | R  |   | S   | P   |
|                            | hproendothéline-1          | L                                       | R  | R  | S  | K  | R  |   | C   | S   |
|                            | hproneurotrophine-3        | T                                       | S  | R  | R  | K  | R  |   | Y   | A   |
|                            | hproPTHrP                  | L                                       | R  | R  | L  | K  | R  |   | A   | V   |
|                            | proPTH                     | K                                       | S  | V  | K  | K  | R  |   | S   | V   |
|                            | hproPDGF-A                 | P                                       | I  | R  | R  | K  | R  |   | S   | I   |
|                            | hproPDGF-B                 | L                                       | A  | R  | G  | R  | A  |   | S   | L   |
|                            | hproTGFβ1                  | S                                       | S  | R  | H  | R  | R  |   | A   | L   |
|                            | mproIGF-I                  | P                                       | A  | K  | S  | A  | R  |   | S   | V   |
|                            | hproIGF-II                 | F                                       | R  | E  | A  | K  | R  |   | H   | R   |
|                            | mproEGF (N term)           | G                                       | H  | H  | L  | N  | R  |   | N   | S   |
|                            | mproEGF (C term)           | R                                       | W  | W  | E  | L  | R  |   | H   | A   |
| ProRécepteurs              |                            |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
|                            | prorécepteur à l'insuline  | P                                       | S  | R  | K  | R  | R  |   | S   | L   |
|                            | prorécepteur à IGF-1       | P                                       | E  | R  | K  | R  | R  |   | D   | V   |
|                            | hintégrine α3              | P                                       | Q  | R  | R  | R  | R  |   | Q   | L   |
|                            | hintégrine αv              | H                                       | L  | I  | T  | K  | R  |   | D   | L   |
|                            | hintégrine α6              | N                                       | S  | R  | K  | K  | R  |   | E   | I   |
|                            | hintégrine α8              | H                                       | Y  | I  | R  | R  | R  |   | E   | V   |
| ProProtéines pathogéniques |                            |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
|                            | gp 160 d'HIV-1             | V                                       | Q  | R  | E  | K  | R  |   | A   | V   |
|                            | Hémagglutinine (HA)        | K                                       | K  | R  | E  | K  | R  |   | G   | L   |
|                            | gp du virus Ebola          | G                                       | R  | R  | T  | R  | R  |   | E   | A   |
|                            | PA de <i>B.anthraxis</i>   | N                                       | S  | R  | K  | K  | R  |   | S   | T   |
|                            | Toxine de <i>Diphteria</i> | G                                       | N  | R  | V  | R  | R  |   | S   | V   |
|                            | proαérolysine (Hémolysine) | K                                       | V  | R  | R  | A  | R  |   | S   | V   |

| Catégories/Précurseurs  | Position par rapport au site de clivage |    |    |    |    |    |   |     |     |
|---|---|----|----|----|----|----|---|-----|-----|
|   | P6                                      | P5 | P4 | P3 | P2 | P1 | ↓ | P1' | P2' |
| <b>Prohormones/proneuropeptides</b>                             |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
| mPOMC   |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
| (JP/ACTH)   | P                                       | R  | E  | G  | K  | R  |   | S   | Y   |
| (ACTH/bLPH)   | P                                       | L  | E  | F  | K  | R  |   | E   | L   |
| (aMSH/CLIP)   | P                                       | V  | E  | K  | K  | R  |   | R   | P   |
| hpro-insuline   |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
| (chaîne B/C)  | T                                       | P  | K  | T  | R  | R  |   | E   | A   |
| (chaîne C/A)  | G                                       | S  | L  | Q  | K  | R  |   | G   | I   |
| rprodynorphine  | R                                       | K  | Q  | A  | K  | R  |   | Y   | G   |
|   | E                                       | D  | L  | Y  | K  | R  |   | Y   | G   |
| rpronociceptine   | K                                       | Q  | L  | Q  | K  | R  |   | M   | P   |
|   | L                                       | A  | N  | Q  | K  | R  |   | F   | S   |
| hpro7B2   | E                                       | R  | R  | K  | R  | R  |   | S   | V   |
| <b>Proprotéines et proenzymes de la matrice extracellulaire</b> |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
| profibrilline   | R                                       | G  | R  | K  | R  | R  |   | S   | T   |
| hprostromélysine-3  | R                                       | N  | R  | Q  | K  | R  |   | F   | V   |
| hproADAM-17 (TACE)  | V                                       | H  | R  | V  | K  | R  |   | R   | A   |
| bproADAM-10 (Kuz)   | L                                       | L  | R  | K  | K  | R  |   | T   | T   |
| hproaggrécane-1 (ADAMTS-4)                                      | R                                       | P  | R  | A  | K  | R  |   | F   | A   |
| hproMT1-MMP   | N                                       | V  | R  | R  | K  | R  |   | Y   | A   |
| hproMT6-MMP   | V                                       | R  | R  | R  | R  | R  |   | Y   | A   |
| <b>Proprotéines sériques</b>                                    |   |    |    |    |    |    |   |     |     |
| proalbumine   | R                                       | G  | V  | F  | R  | R  |   | D   | A   |
| profacteur IX   | L                                       | N  | R  | P  | K  | R  |   | Y   | N   |
| profacteur X  | L                                       | E  | R  | R  | K  | R  |   | S   | V   |
| profacteur von Willebrand                                       | S                                       | H  | R  | S  | K  | R  |   | S   | L   |
| rprocomplément C3   | L                                       | N  | R  | P  | K  | R  |   | Y   | N   |
| hproprotéine C  | R                                       | S  | H  | L  | K  | R  |   | D   | T   |

adapté de Seidah et Chrétien, 1997, 1999  
et de Molloy et al., 1999

Cette homologie est également conservée entre les différents organismes, soit les mammifères, les levures et les bactéries. Le noyau du domaine catalytique est composé de 7 feuillets bêta et de 5 hélices alpha (HENRICH *et al.*, 2003). En leurs centres, les convertases ont des ions essentiels à leurs activités enzymatiques, qui y sont emprisonnés. Le domaine catalytique est le domaine qui renferme le site actif de l'enzyme. Trois résidus hautement conservés, Ser, His et Asp en plus d'un résidu Asn (Asp pour SPC2), sont responsables de l'activité catalytique de ce dernier (SIEZEN *et al.*, 1991).

Le rôle du domaine catalytique est l'endoprotéolyse de substrats protéiques (tableau 2). Certaines convertases, dont PC1 et PC2, reconnaîtront et cliveront une seule paire de résidus basiques (SEIDAH et CHRÉTIEN, 1997) alors que d'autres, tel que la furine, reconnaîtront des sites composés de deux paires de résidus basiques. La furine reconnaîtra une séquence minimale Arg-X-X-Arg ou optimale Arg-X-Lys/Arg-Arg où X représente un acide aminé quelconque, sauf cystéine, et rarement proline (MOLLOY *et al.*, 1992 ; HOSAKA *et al.*, 1991). Par contre, certains substrats ne correspondent pas à cette séquence. Des études ont démontré que les résidus en position X dans la séquence minimale Arg-X-X-Arg, ainsi que ceux en C-terminal de la séquence, définissaient la spécificité de chaque convertase (MATTHEWS *et al.*, 1994 ; JEAN *et al.*, 1995a ; JEAN *et al.*, 1995b). De façon générale, le motif reconnu par l'ensemble des convertases est Arg/Lys-X<sub>n</sub>-Arg où n = 0, 2, 4 ou 6 (SEIDAH et CHRÉTIEN, 1999).

## **Domaine P**

Le domaine P contient une séquence conservée pentapeptidique RRGDL, située au centre de celle-ci. C'est un autre domaine hautement conservé chez les PC. Par contre, ce dernier est absent chez les subtilisines. Il a été déterminé que le domaine P est essentiel à l'activité enzymatique des protéines le portant (HATSUZAWA *et al.*, 1992, TAKAHASHI *et al.*, 1993 ; TAKAHASHI *et al.*, 1995). Son rôle n'est pas encore clairement identifié, mais dans sa structure, on retrouve une séquence de localisation cellulaire (LUSSON *et al.*, 1997). Il stabiliserait aussi la structure du domaine catalytique en protégeant du solvant les régions plus hydrophobes (GLUSCHANKOF et FULLER, 1994 ; ZHONG *et al.*, 1996 ; HENRICH *et al.*, 2003). Il sert aussi à emprisonner les ions calcium dans la structure tertiaire de la convertase.

## **Autres régions**

La partie C-terminale des PC est beaucoup moins conservée que les domaines décrits précédemment. Par contre, elle confère certaines caractéristiques spécifiques. Par exemple, on y retrouve les régions transmembranaire et cytoplasmique de la furine qui contiennent l'information nécessaire pour l'acheminement de l'enzyme et sa localisation cellulaire. Généralement retrouvée dans le trans-Golgi, la furine voyage entre le TGN, la membrane plasmique et les endosomes, selon l'état de phosphorylation de la queue C-terminale et l'interaction entre les protéines cytosoliques (SCHAFER *et al.*, 1995 ; TAKAHASHI *et al.*, 1995 ; JONES *et al.*,



1995 ; MOLLOY *et al.*, 1998 ; MOLLOY *et al.*, 1999 ; WAN *et al.*, 1998 ; TEUCHERT *et al.*, 1999 ; STROH *et al.*, 1999).

Finalement, on retrouve chez les convertases furine, SPC4, SPC6 et SPC7, une région riche en cystéines dont le rôle est plus ou moins clair encore aujourd'hui (NAKAGAWA *et al.*, 1993 ; ROEBROEK *et al.*, 1992).

### **1.3.3 Localisation tissulaire des PC**

Une approche utilisée afin de déterminer le rôle potentiel d'une protéine dans divers processus biologiques consiste dans un premier temps, à étudier son niveau d'expression tissulaire lors du développement de l'embryon et dans un deuxième temps, d'analyser sa localisation cellulaire. De nombreux groupes de recherche ont suivi ces différentes étapes dans le but de déterminer le patron d'expression des différentes convertases à proprotéines.

De ces études, il ressort que les convertases peuvent être divisées en quatre groupes selon leurs patrons d'expression d'ARNm et de protéines. La furine (SCHALKEN *et al.*, 1987 ; HATSUZAWA *et al.*, 1990 ; DAY *et al.*, 1993 ; SCHAFER *et al.*, 1993) et SPC7 (MEERABUX *et al.*, 1996 ; BRUZZANITI *et al.*, 1996 ; SEIDAH *et al.*, 1996 ; CONSTAM *et al.*, 1996) forment le premier groupe, avec une expression ubiquiste majoritairement sécrétée par la voie constitutive. Par contre, le niveau d'expression est variable d'une cellule à l'autre. L'expression généralisée de la furine peut être expliquée par le fait qu'elle est régulée par trois promoteurs. Le premier, P1,

est modulable alors que les deux autres, P1A et P1B, sont plutôt de type constitutif (AYOUBI *et al.*, 1994). L'ARNm de la furine est détecté dès la 7<sup>ème</sup> journée de vie embryonnaire. Son expression est uniforme chez l'embryon jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour où une expression plus intense au niveau du cœur et du foie est observée. En migration, la furine est abondamment exprimée dans toutes les zones précartilagineuses des centres squelettiques, par exemple le primordium cartilagineux du crâne, des vertèbres, des côtes et des fémurs (ZHENG *et al.*, 1994). Au niveau cellulaire, on retrouve la furine en abondance dans le TGN même si des études récentes ont démontré qu'elle peut transloquer entre la surface cellulaire et le TGN via les endosomes (MALLET *et al.*, 1999 ; SCHAFER *et al.*, 1995 ; SHAPIRO *et al.*, 1997). De son côté, SPC7 semble être concentré dans les compartiments post-Golgi le long de la voie de sécrétion constitutive surtout dans les vésicules issues du trans-Golgi plutôt que dans le TGN lui-même (WOUTERS *et al.*, 1998).

La SPC4 (KIEFER *et al.*, 1991 ; DONG *et al.*, 1995 ; ZHENG *et al.*, 1997 ; NAGAMUNE *et al.*, 1995) et les deux isoformes de SPC6 (NAKAGAWA *et al.*, 1993 ; LUSSON *et al.*, 1993 ; DONG *et al.*, 1995 ; ZHENG *et al.*, 1997) forment le deuxième groupe. Ces PCs sont elles aussi exprimées de façon ubiquiste. Par contre, elles interagissent avec les précurseurs autant de la voie constitutive que de la voie régulée. La localisation cellulaire de SPC4 n'est toujours pas clairement établie mais il est connu que les deux isoformes SPC6A et SPC6B ne se retrouvent pas au même endroit dans la cellule. Bien qu'ils soient issus du même gène, SPC6A est retrouvé

dans les granules de sécrétions denses alors que SPC6B est plutôt retrouvé dans l'appareil de Golgi sans être présent dans le TGN (DE BIE *et al.*, 1996).

SPC2 (SMEEKENS et STEINER, 1990 ; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1993 ; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1994 ; SEIDAH *et al.*, 1990 ; SCHAFER *et al.*, 1993 ; ZHENG *et al.*, 1994) et SPC3 (SEIDAH *et al.*, 1990 ; SEIDAH *et al.*, 1991 ; SMEEKENS *et al.*, 1991) forment le troisième groupe et ont une expression beaucoup plus restreinte. Elles sont spécialisées dans la maturation des précurseurs endocriniens et neuroendocriniens. Leur expression est limitée au cerveau, aux îlots pancréatiques et aux glandes surrénales. Elles maturent les proneuropeptides et prohormones des granules de sécrétion de façon beaucoup plus contrôlée. Leur expression a aussi été observée chez les cellules inflammatoires, par exemple les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages et les cellules mononucléaires de la rate (VINDROLA *et al.*, 1994). Étant donné leurs rôles dans la maturation de produits neuroendocriniens, SPC2 et SPC3 sont majoritairement retrouvés dans les vésicules de sécrétion denses et dans le TGN (MALIDE *et al.*, 1995).

Finalement, SPC5 forme le quatrième et dernier groupe. Son expression est confinée aux cellules germinales testiculaires et ovariennes (NAKAYAKA *et al.*, 1992 ; SEIDAH *et al.*, 1992 ; TORII *et al.*, 1993).

#### 1.3.4 Les inhibiteurs des convertases à proprotéines

Étant donné qu'un seul inhibiteur de PC a été utilisé, cette section ne fera qu'un survol du sujet. Par contre, le lecteur pourra approfondir le thème à l'aide des nombreuses références. Deux grandes familles d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques sont utilisées dans les études touchant les convertases à proprotéines. La première famille couvre les inhibiteurs chimiques qui sont bien souvent toxiques pour les cellules et plus ou moins spécifiques. Certains inhibiteurs chimiques utiliseront la dépendance à certains métaux des convertases, pour inhiber leur activité. Par exemple, l'EDTA et l'EGTA, deux chélateurs de calcium, agiront tous deux à des concentrations de 5 mM. De la même façon, la dépendance au  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , et  $\text{Cu}^{2+}$  peut être exploitée à des fins d'inhibition. Les inhibiteurs traditionnels des protéases à sérine (PMSF, DFP, leupeptin et antipain) sont d'une très faible efficacité pour la furine (HATSUZAWA *et al.*, 1992).

La seconde classe est formée d'inhibiteurs de nature peptidique ou protéique. Ces inhibiteurs utilisent la séquence de reconnaissance furine pour entrer en contact avec le domaine catalytique des PC de façon spécifique et pour y rester lié. Ces inhibiteurs sont soit issus de synthèses peptidiques, soit de la modification de molécules ayant un pouvoir d'inhibition basale. La première utilisée a été une molécule de chlorométhylcétone (decanoyl-Arg-Glu-Lys-Arg- $\text{CH}_2\text{Cl}$ ) portant un site de reconnaissance furine (HALLENBERGER *et al.*, 1992). Il a été démontré que cette molécule avait la capacité de bloquer la maturation de plusieurs précurseurs glycoprotéiques d'enveloppes virales (HALLENBERGER *et al.*, 1992 ; GARTEN *et al.*, 1994 ; VEY *et al.*, 1995 ; ORTMANN *et al.*, 1994). Son action sur la furine est

irréversible. Par contre, sa spécificité n'est pas exclusive à la furine et le decanoyl peut agir sur l'activité d'autres membres de la famille des convertases.

D'autres versions du chlorométhylcétone ont été développées dans le but d'éliminer les problèmes mentionnés précédemment (ANGLIKER, 1995). Les derniers inhibiteurs peptidiques à avoir été développés sont les oligopeptides de L- et D-polyarginine. Leur efficacité est de l'ordre du nanomolaire et ils semblent non toxiques (CAMERON *et al.*, 2000 ; KACPRZAK *et al.*, 2004 ; KIBLER *et al.*, 2004).

Des protéines ont aussi été utilisées afin d'inhiber l'activité de différentes convertases à proprotéines. Certains groupes de recherche ont pris avantage de la capacité inhibitrice de la partie pro des convertases de façon à inhiber leur activité (BOUDREAU *et al.*, 1998). Même si ces résultats semblent indiquer que les prodomaines de convertases pourraient servir d'inhibiteurs, les auteurs ont rapporté qu'un problème de stabilité, même *in vitro*, risque d'empêcher leur utilisation.

Les serpins (serine protease inhibitors) sont des inhibiteurs endogènes des protéases à sérine régulant plusieurs processus biologiques (POTEMPA *et al.*, 1994). La spécificité des différentes serpins est dictée par la séquence des différents résidus qui forment leur site actif. L' $\alpha_1$ -antitrypsine ( $\alpha_1$ -AT) de type sauvage est une serpine inhibant spécifiquement l'élastase. Afin de modifier sa spécificité, deux mutants de l' $\alpha_1$ -AT ont été créés. L' $\alpha_1$ -antitrypsine Pittsburgh (AT-PIT) porte une mutation changeant une Met en Arg au site actif. De cette façon, l'inhibition endogène de l'élastase est perdue au

profit de la thrombine (LEWIS *et al.*, 1978; OWEN *et al.*, 1983). Le deuxième mutant porte une modification formant une séquence de reconnaissance furine (ANDERSON *et al.*, 1993). Ce mutant, nommé  $\alpha_1$ -antitrypsine Portland (AT-PDX), s'est avéré être un inhibiteur de la furine spécifique et extrêmement efficace avec un  $K_i$  de 0.6 nM. En tant que protéine, l'utilisation d'un plasmide codant pour celle-ci est donc possible, éliminant le problème de transport intracellulaire lié à d'autres inhibiteurs chimiques. L'AT-PDX représente donc un outil puissant en tant qu'inhibiteur spécifique de la furine.

### **1.3.5 Les convertases en conditions pathologiques**

Il est connu depuis déjà un certain nombre d'années, que la furine joue un rôle important dans la maturation de plusieurs glycoprotéines présentes à la surface de certains virus et essentielles pour leur pathogénicité. C'est le cas de la glycoprotéine gp160 du VIH (HALLANGER. *et al.*, 1992 ; DECROLY *et al.*, 1994) et de la glycoprotéine de l'enveloppe des souches Zaïre et Ivory Coast du virus Ebola (VOLCHKOV *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que dans ce dernier cas, il existe une souche du virus Ebola nommée Reston, qui ne porte pas de séquence de reconnaissance furine au sein de la glycoprotéine et qui est non pathogénique pour l'humain (FELDMANN *et al.*, 1999). Des toxines bactériennes nécessitent aussi une maturation par la furine afin d'acquérir leur virulence. Par exemple, le facteur PA, une composante de la toxine de l'anthrax, contient un site de reconnaissance furine et sans le clivage de cette dernière, la toxine est incapable de s'assembler adéquatement et devient non létale (GORDON *et al.*, 1995).

La furine semble être aussi impliquée dans diverses maladies qui ont un impact grandissant sur la santé publique. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer qui est causée par la formation de plaques amyloïdes causant la neurodégénérescence. Dans cette maladie, la furine serait impliquée dans la maturation des  $\alpha$  et  $\beta$ -secrétase. Il s'agit de deux métalloprotéinases de la famille ADAM (a disintegrin and metalloprotease) dépendantes du zinc qui clivent de façon anormale le précurseur de la protéine  $\beta$ -amyloïde ( $\beta$ -mayloid precursor protein : APP). Il y aura alors relâchement d'un peptide ayant un rôle connu dans la formation des plaques amyloïdes (ISACSON *et al.*, 2002 ; WALTER *et al.*, 2001 ; WANG *et al.*, 2000 ; ANDERS *et al.*, 2001).

La furine est aussi importante dans la progression tumorale. Des niveaux élevés de furine dans les tumeurs sont corrélés avec une augmentation de l'agressivité des cancers de la tête, du cou et du poumon (MBIKAY *et al.*, 1997 ; BASSI *et al.*, 2001a). La furine participe au processus de progression tumoral par son rôle dans la maturation de métalloprotéases de la matrice extracellulaire et l'invasion des cellules métastatiques. C'est l'action combinée de la MT1-MMP qui est maturée par la furine et de la MMP2 qui est à son tour maturée par la MT1-MMP qui favoriseront l'invasion tumorale (BASSI *et al.*, 2001b ; SOUNNI *et al.*, 2002). Le TGF $\beta$  est aussi impliqué dans ce processus. Suite à sa maturation par la furine, il peut augmenter les niveaux extracellulaires de MMP2 (McMAHON *et al.*, 2003).

De façon surprenante, très peu de cas de maladies liées à une altération dans la maturation protéique par les convertases ont été rapportés jusqu'à maintenant. Toutefois, une mutation dans le gène de SPC3 a été identifiée chez une patiente. Cette mutation empêche la maturation de la proconvertase et conséquemment sa rétention dans le RE. La patiente atteinte démontre alors un phénotype d'obésité et de pro-insulinémie (JACKSON *et al.*, 1997).

Une étude récente a démontré que chez un adulte sain, la furine était exprimée par les chondrocytes de la couche superficielle du cartilage articulaire. Par contre, chez un patient arthritique, la furine était exprimée non seulement par les chondrocytes de la couche superficielle, mais aussi par ceux de la couche profonde (MOLDOVAN *et al.*, 2000). Même si ce résultat n'a pas été discuté en détail par les auteurs, il serait réaliste d'imaginer que l'augmentation de l'expression de la furine dans la couche profonde du cartilage articulaire représente une action des chondrocytes afin de réparer le cartilage via la maturation de facteurs anaboliques.

#### **1.4 La furine et l'ossification endochondrale**

Une excellente façon de démontrer la participation des convertases dans un processus pathologique ou biologique consiste à évaluer leur implication dans la maturation de précurseurs impliqués de façon importante dans ceux-ci. Quatre facteurs de croissance, ayant un rôle important dans le processus de l'ossification endochondrale, sont maturés par la furine.



### 1.4.1 Le TGFβ1

Le TGFβ1 est le prototype de la superfamille du TGFβ comprenant les BMP (bone morphogenetic protein) dont les rôles dans l'ossification endochondrale seront discutés plus loin, les activines/inhibines ainsi que d'autres membres partageant les mêmes similitudes structurelles et fonctionnelles. Le TGFβ1, qui fait l'objet d'étude dans le laboratoire du D<sup>re</sup> Claire Dubois, est sécrété par différents types cellulaires, entre autres par les chondrocytes, les synoviocytes, les lymphocytes et les macrophages, sous une forme de précurseur (LAFYATIS *et al.*, 1989 ; DUBOIS *et al.*, 1995 ; GENTRY *et al.*, 1988a ; GENTRY *et al.*, 1988b ; YANG *et al.*, 2001). Ce précurseur doit être clivé pour relâcher une cytokine biologiquement activable. Bien que différents types d'enzymes soient capables de cliver le pro-TGFβ au site de reconnaissance furine, le clivage par la convertase furine se fait de façon spécifique (LYONS *et al.*, 1988 ; SATO et RIFKIN, 1989 ; BLANCHETTE *et al.*, 1997). Il a été démontré au laboratoire que le TGFβ avait une action de régulation de l'activité transcriptionnelle du gène de la furine formant ainsi une boucle de rétroaction positive (BLANCHETTE *et al.*, 1997).

Le TGFβ est exprimé durant le développement du squelette et joue un rôle important dans la régulation de la prolifération ainsi que dans la différenciation des chondrocytes (FUKUMURA *et al.*, 1998 ; HORNER *et al.*, 1998 ; KABASAWA *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que le TGF-β pouvait induire les cellules du mésenchyme à se différencier en chondrocytes (KULYK *et al.*, 1989 ; LAFEVER *et*

*al.*, 1999 ; DENKER *et al.*, 1995). Des études ont aussi prouvé qu'une fois injecté, le TGF $\beta$  avait la capacité de provoquer la formation de cartilage chez le rat et la souris (JOYCE *et al.*, 1990; CHIMAL-MONROY et DIAZ DE LEON, 1997). De la même façon, le TGF $\beta$  peut inhiber la différenciation hypertrophique des chondrocytes en culture (TSCHAN *et al.*, 1993 ; DIEUDONNE *et al.*, 1994 ; BOHME *et al.*, 1995). De plus, chez des souris transgéniques, la perte de réponse au TGF $\beta$  par les chondrocytes résulte en un phénotype ayant plusieurs similitudes avec l'ostéoarthrite chez l'humain (SERRA *et al.*, 1997 ; YANG *et al.*, 2001). Ces études indiquent que le TGF $\beta$  est un régulateur clé de la formation des os.

#### **1.4.2 Le BMP4**

Les *bone morphogenetic proteins* (BMP) ont originellement été identifiés comme des molécules sécrétées ayant la capacité d'induire la formation d'os par le processus d'ossification endochondrale (SAMPATH et REDDI, 1981). Le clonage subséquent de ces molécules a révélé que la famille des BMP était constituée de plusieurs protéines ayant diverses actions biologiques dans le développement de différents organes et tissus (WOZNEY *et al.*, 1988 ; HOGAN, 1996). L'analyse de l'expression des différents BMP a révélé qu'ils ont une distribution propre à chacun mais qu'il existe une coexpression dans certains tissus. Par exemple, il a été rapporté que *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* et *Gdf5* étaient exprimés dans le perichondrium et qu'ils participaient à la formation et au développement du cartilage (MACIAS *et al.*, 1997 ; ZOU *et al.*, 1997 ; FRANCIS-WEST *et al.*, 1999). Il est connu que le proBMP-4 doit être clivé de façon à générer une molécule active avec un pouvoir de signalisation, mais

récemment, il été démontré que la furine avait la capacité de maturer celui-ci (CUI *et al.*, 2001).

Dans le but de déterminer le rôle physiologique des BMP dans la formation des os, une étude d'inactivation des signaux de différents BMP a été entreprise avec la surexpression de Noggin, un antagoniste naturel des BMP dans le cartilage. Les souris transgéniques résultantes sont déficientes pour la majorité des composantes squelettiques, suggérant que la signalisation par les BMP est essentielle à la formation du cartilage. Par la suite, une seconde série de souris transgéniques a été utilisée pour étudier BMP-4 de façon spécifique. La surexpression de BMP-4 dans le cartilage cause un accroissement de la production de cartilage et favorise la maturation des chondrocytes (TSUMAKI *et al.*, 2002). L'action du BMP-4 semble être de promouvoir la différenciation des cellules du mésenchyme en chondrocytes matures (HATAKEYAMA *et al.*, 2004). Jusqu'à maintenant, il a été malheureusement impossible d'obtenir des souris transgéniques déficientes en BMP-4, puisque de telles souris meurent à une étape précoce lors de la gestation (WINNIER *et al.*, 1995).

#### **1.4.3 La PTHrP**

Lors de l'ossification endochondrale, la croissance longitudinale est assurée par les chondrocytes en prolifération, formant des colonnes verticales. Cette prolifération unidirectionnelle des chondrocytes ainsi que leur transition du phénotype prolifératif, formateur de cartilage, à hypertrophique, minéralisation du cartilage, sont des événements charnières dans la formation des os. Le *parathyroid hormone related*

*peptide* (PTHrP) est un peptide sécrété produit par les chondrocytes et par plusieurs tissus embryonnaires et adultes ayant un mode d'action paracrine ou autocrine (KRONENBERG *et al.*, 1996). Le PTHrP inhibe la conversion des chondrocytes en prolifération en chondrocyte hypertrophique (KRONENBERG et CHUNG, 2001). Son action se fait via le récepteur du PTH/PTHrP, soit le PPR, exprimé à de faibles niveaux chez les chondrocytes en prolifération et à de hauts niveaux chez les chondrocytes préhypertrophiques (VORTKAMP *et al.*, 1996). Il a été démontré que ce peptide était synthétisé sous forme de pro-PTHrP inactif et qu'il était maturé par la furine (HENDY *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1995; LAZURE *et al.*, 1998)

Un modèle de souris transgénique PTHrP<sup>-/-</sup> a été développé (KARAPLIS *et al.*, 1994). Ces souris meurent durant la période périnatale et souffrent de sévères malformations squelettiques, principalement des os issus de l'ossification endochondrale (VORTKAMP *et al.*, 1996). L'étude histologique des os issus de ces souris a démontré que l'absence de PTHrP engendrait une minéralisation précoce du cartilage à cause d'une transition prématurée des chondrocytes en prolifération en chondrocytes hypertrophiques. Dans un autre modèle de souris transgéniques où le PTHrP a été surexprimé, celles-ci démontrent un ralentissement marqué de la différenciation terminale des chondrocytes et une minéralisation retardée du cartilage (WEIR *et al.*, 1996 ; AMLING *et al.*, 1997).

Le rôle critique joué par le PTHrP chez l'humain a été mis en évidence lorsque deux chondrodysplasies, les *Blomstrand's lethal chondrodysplasia* (BLC) et *Jansen's*

*metaphyseal chondrodysplasia* (JMC), ont été liées à des mutations dans le récepteur PPR. Dans le cas du BLC, les patients atteints présentent une minéralisation précoce et anormale des os. L'ossification endochondrale est avancée de façon marquée et la région des os formée de chondrocytes en prolifération est virtuellement inexistante (BLOMSTRAND *et al.*, 1985). Des études génétiques ont démontré que cette maladie était causée par une mutation qui a pour conséquence d'inactiver le PPR. Inversement, dans le cas du JMC, c'est plutôt un récepteur PPR constitutivement actif qui est la cause de cette maladie (SCHIPANI *et al.*, 1995 ; SCHIPANI *et al.*, 1996). Ces patients souffrent de nanisme sévère dû à un retard important dans le développement de l'ossification endochondrale ainsi que d'un taux élevé de calcium et de phosphate sanguin (JANSEN, 1934 ; KRUSE et SCHUTZ, 1993).

#### **1.4.4 La CHM-I**

Le cartilage est avasculaire. Cette particularité en fait une structure biologique unique. Dans les étapes qui mènent à la formation des os lors de l'ossification endochondrale, le cartilage formé est résistant à l'invasion vasculaire. Par contre, avec la maturation du cartilage parallèlement à la différenciation des chondrocytes, des vaisseaux sanguins envahissent le cartilage hypertrophique. Cette étape marque la fin du cartilage et le début de la minéralisation. Au début des années 90, la molécule chondromodulin-I (CHM-I), responsable de la résistance du cartilage à la vascularisation, a été identifiée (HIRAKI *et al.*, 1991). CMH-I est une glycoprotéine dont l'ARNm est retrouvé en abondance dans le cartilage fœtal et dans les zones de prolifération et préhypertrophique cartilagineuse chez l'adulte. Par contre, elle est

absente dans les zones hypertrophiques et de minéralisation. CHM-I est le premier modulateur et facteur anti-angiogénique naturel à avoir été identifié et isolé dans le cartilage. Il inhibe la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et la formation de vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales bovines (HIRAKI *et al.*, 1995). Ce facteur de croissance a la capacité de stimuler la synthèse d'ADN et du protéoglycan par les chondrocytes (SUZUKI, 1996). Comme beaucoup de protéines, le précurseur du CHM-I doit subir un clivage protéolytique avant d'être biologiquement actif. Il a été déterminé que la furine est responsable de cette maturation (AZIZAN *et al.*, 2001)

### **1.5 L'ostéoarthrite en tant que pathologie type du cartilage**

L'ostéoarthrite est la maladie non-inflammatoire la plus commune des articulations. Elle se distingue de l'arthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune inflammatoire systémique, ciblant particulièrement les articulations. L'ostéoarthrite est caractérisée par une perte progressive du cartilage articulaire associée à de la douleur menant à la perte de fonctions des articulations. Cette maladie touche 10 % de la population mondiale et on estime que 50 % des personnes âgées de 60 ans et plus en sont atteintes. D'ailleurs aux États-Unis, approximativement 16 millions de personnes souffrent de cette condition. Tenant compte du vieillissement de la population, les coûts sociaux reliés à cette pathologie risquent d'atteindre des sommes colossales. Encore aujourd'hui, les seuls médicaments ayant un effet bénéfique sur le bien-être des patients sont ceux de type anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui ont un effet inhibiteur sur la COX-2. Ces médicaments sont prescrits afin d'atténuer la douleur et

diminuer l'inflammation. Mis à part que ces derniers contrôlent les symptômes arthritiques, ils ne traitent pas l'ostéoarthrite, mais ils peuvent en plus causer des problèmes gastriques comme des ulcères, des saignements et des plaies pouvant s'avérer très graves. De plus, un risque plus élevé de crise cardiaque et d'accident cérébrovasculaire a été rapporté lors de l'utilisation de valdecoxib (Bextra), celecoxib (Celebrex) et refocoxib (Vioxx).

Bien que de nombreuses recherches entretiennent l'espoir de trouver une thérapie, comme dans le cas de plusieurs maladies multifactorielles, il est actuellement difficile de déterminer la ou les meilleures cibles thérapeutiques. La dernière grande découverte dans ce champ d'études a été la démonstration indiquant que l'interleukine-1 (IL-1) est une molécule-clé dans le processus catabolique du cartilage articulaire lors de l'ostéoarthrite (PUJOL et LOYAL, 1987 ; PELLETIER et MARTEL-PELLETIER, 1989). Il a aussi été démontré que l'IL-1 avait la capacité d'induire la production d'enzymes catalysant la dégradation du cartilage, les métalloprotéases, en plus de supprimer la production des constituants majeurs du cartilage tel le collagène de type II et l'aggrécan (BENTON et TYLER, 1988 ; GOLDRING *et al.*, 1988 ; CAWSON *et al.*, 1999 ; FLANNERY *et al.*, 1999). Depuis, à cause de son action néfaste sur l'intégrité du cartilage, le système IL-1 et son effet inductif sur les chondrocytes est devenu la cible de nombreuses recherches visant à développer une avenue thérapeutique. De plus, des efforts considérables ont été mis de l'avant pour produire des inhibiteurs des métalloprotéases induits par l'IL-1 et développer une approche pour bloquer la liaison de cette dernière à son récepteur

(HUNG *et al.*, 1994). Il est clair qu'une meilleure compréhension des événements cellulaires et moléculaires menant à l'érosion du cartilage permettrait de mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques.

Malgré de nombreuses recherches, l'origine même de la maladie est toujours inconnue. Une théorie développée ces dernières années et soutenue par plusieurs résultats expérimentaux semble faire lentement sa place. Tel qu'expliqué précédemment, lors de l'ossification endochondrale, le cartilage passe par une série d'étapes de différenciation menant ultimement à son hypertrophie, à sa minéralisation, puis à l'ossification. Par contre, le cartilage articulaire ne suit pas ces étapes et arrête le processus avant l'hypertrophie. Selon cette hypothèse, les chondrocytes articulaires, responsables de maintenir l'intégrité du cartilage articulaire, briseraient leur état de quiescence et progresseraient de façon anormale vers une différenciation terminale (YANG *et al.*, 2001 ; LANNONE *et al.*, 2003). Cette différenciation pousse les chondrocytes à exprimer un éventail de gènes complètement différents de ceux exprimés normalement et les rend incapables de maintenir l'intégrité du cartilage articulaire. Il s'ensuit une dégénérescence du cartilage puis l'ostéoarthrite.

## **1.6 Pertinence et objectifs de recherches**

Par sa capacité à maturer plusieurs facteurs de croissance importants impliqués dans la différenciation des chondrocytes, la formation du cartilage et son maintien, la furine pourrait s'avérer une cible thérapeutique intéressante dans le cadre de



- l'ostéoarthrite. Cette maladie est caractérisée par une diminution des processus anaboliques que nous croyons être causée par un bris de leur état de quiescence. Les chondrocytes progresseraient de façon anormale vers une différenciation terminale si bien que les facteurs de croissance impliqués dans la formation et le maintien du cartilage sont insuffisants pour maintenir l'homéostasie. Un retour vers un état d'équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques serait donc souhaitable. Nos objectifs de recherche étaient donc d'étudier l'expression du gène de la furine lors de la différenciation de la lignée cellulaire ATDC5 en tant que modèle cellulaire d'ossification endochondrale, puis de déterminer le ou les facteurs de transcription impliqués dans cette régulation.

L'identification d'un facteur de transcription régulant le gène de la furine et impliqué dans la formation du cartilage ouvrirait la voie à une nouvelle avenue dans le traitement de l'ostéoarthrite. Il a été démontré que la surexpression de la furine pouvait mener à une augmentation de la production de facteurs de croissance matures (NAKAJIMA *et al.*, 2002). Cette même surexpression permettrait, dans un premier temps, de bloquer la différenciation des chondrocytes articulaires grâce à l'action du TGF- $\beta$  et du PTHrP puis dans un second temps, de promouvoir la production de cartilage articulaire via l'action du BMP-4.

## **2. PUBLICATION**

Implication du facteur de transcription SOX9 dans la régulation du gène  
*FUR* lors de la différenciation chondrogénique des cellules ATDC5

Philippe Guimont, Francine Grondin et Claire M. Dubois

**Article soumis au journal : Journal of Biological Chemistry**

**Contribution de l'étudiant :**

En ce qui concerne les travaux contenus dans la publication incluse dans ce mémoire, Philippe Guimont a participé à l'écriture de cet article sous la supervision de sa directrice de recherche. Également, l'étudiant a réalisé toutes les expériences présentées.

**INVOLVEMENT OF SOX9 IN *FUR* GENE REGULATION DURING  
CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF ATDC5 CELLS**

**Philippe Guimont, Francine Grondin and Claire M. Dubois**

**From the Immunology Division, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, QC, Canada**

Running Title: *Fur* Gene Regulation In Chondrogenic Differentiation

Address correspondence to: Claire M. Dubois, Immunology Division, Faculty of Medicine,  
Université de Sherbrooke, 3001, 12<sup>e</sup> Avenue Nord, Sherbrooke QC, Canada, J1H 5N4, Tel.  
819 564-5289; Fax. 819 564-5215; E-Mail: [cmdubois@courrier.usherb.ca](mailto:cmdubois@courrier.usherb.ca)

The proprotein convertase furin is ubiquitously expressed in vertebrates and is involved in the processing of a variety of substrates, some of which are key to normal chondrogenesis events. To gain insights into the regulation of furin during chondrogenesis, we used the mouse prechondrogenic ATDC5 cell line, an established in vitro model of cartilage differentiation. Increased expression of furin mRNA was observed during chondrogenic differentiation, an event that correlated with increased mRNA levels of Sox9, a potent HMG-box-containing transcription factor required for cartilage formation. Transient transfection of Sox9 in non-chondrogenic cells resulted in a marked increase in furin mRNA and in the transactivation of the furin P1A promoter. Direct Sox9 action on the P1A promoter was narrowed down to a critical canonical site with Sox9 binding capability by EMSA. Sox9 transactivation effect was inhibited by L-Sox5 and Sox6, two Sox9 homologs expressed in a differential fashion as opposed to furin in ATDC5 cells. Sox6 inhibitory effect was reduced when using Sox6-HMG-box mutants, indicating a repressive effect through direct HMG-box/DNA binding. Taken together, these results indicate that Sox9 positively regulates furin expression during chondrogenesis. They also suggest a negative regulatory role for Sox6 in this regulation.

## Introduction

Cartilage is a complex tissue containing a unique set of extracellular matrix (ECM) that provides the tissue its ability to withstand compression and frictional stress associated with joint movement (1). Chondrocytes at different stages of differentiation are responsible for the precise production of ECM in several different types of cartilage tissue in the developing vertebrate including growth plate cartilage and articular cartilage (2). The acquisition of the chondrocyte phenotype occurs along a major pathway of differentiation of mesenchymal cells involving coordinate expression of growth factors, receptors as well as signal transduction molecules.

Many of these molecules are synthesized as proproteins and require proteolytic processing to generate functional peptide products. For example, the parathyroid hormone related peptide (PTHrP) is essential for the transition from prehypertrophic to hypertrophic stage of chondrogenesis (3-5). Both PTHrP and PTHrP receptor (PPR) null mice show premature mineralization and ossification that appear to be related to premature transition of proliferative to hypertrophic chondrocytes (4,6). Members of the TGF $\beta$  family, including TGF $\beta$ s and BMPs, are essential for proper chondrocyte differentiation and production of cartilage matrix. The loss of responsiveness to TGF $\beta$  in mice promotes terminal differentiation of chondrocytes and results in degenerative joint disease resembling osteoarthritis (7,8).

All these polypeptides above are substrate for the proprotein convertase (PCs) named furin. It is an essential endoprotease of the constitutive secretory pathway (9-12). Furin is involved in the activation of a variety of precursor proteins through proteolysis at the C-terminal side of the optimal consensus sequence Arg-X-Lys/Arg-Arg (13-14). It has an essential role in developmental processes and increasing evidence suggests that furin plays a key role in cartilage development. By midgestation stages, furin is abundantly expressed in all precartilaginous bodies in skeletogenic centers, such as the cartilage primodium of cephalic bones, vertebral bodies, ribs and femurs (15). An appropriate localization and expression level of furin seems to be important for the maintenance of normal cartilage. It was shown that in normal articular cartilage, immunoreactive furin is almost exclusively expressed in chondrocytes of the superficial zone whereas in osteoarthritis cartilage, its expression is modified and detected in articular cells throughout the cartilage tissue (16). To date, however, the mechanisms that control furin gene expression in chondrocytes remain unknown.

A number of studies have searched for transcription factors that control chondrocyte differentiation. Sox (Sry-type HMG box) proteins, which form a subfamily of DNA-binding proteins that features a high-mobility-group (HMG) domain, have critical functions in a number of developmental processes, including sex determination (17,18), neurogenesis (19,20), and skeleton formation (21-23). The minimal consensus binding sequence for Sox proteins has been defined as the heptameric sequence (A/T)(A/T)CAA(A/T)G (24,25). Analysis of the furin P1, P1A

and P1B promoter sequences reveals the presence of putative DNA recognition elements for members of the Sox transcription factors, including several closely spaced sites characteristic of Sox9-regulated genes. One of the earliest molecules required for cell commitment during skeletogenesis is Sox9 (26, 27). An essential role for Sox9 in cartilage formation was demonstrated by the identification of *Sox9* mutations in patients with campomelic dysplasia (28), a disease characterized by severe malformations of essentially all cartilage-derived structure and associated in some case with XY sex reversal (29-31). In mouse and human embryonic cartilages, Sox9 directly regulates the transcription of *Col2a1* (21,22), *Col9a1* (32), *Col11a1* (33,34) and *Agc* (35) genes involved in cartilage matrix formation. The most convincing evidence that Sox9 is required for mesenchymal condensation comes from mouse genetic studies. In chimaeric murine embryos, *Sox9*<sup>-/-</sup> embryonic stem (ES) cells, are excluded from mesenchymal condensation, indicating that Sox9 is essential for their formation (27).

The finding that furin is involved in the maturation/activation of several growth factors and hormones synthesized by chondrocytes, coupled with the observation that the *fur* promoter contains multiple SOX motifs, prompted us to investigate the expression and regulation of the *fur* gene in chondrocytes. In this report, we demonstrate the developmental expression profile of furin in the mouse prechondrogenic ATDC5 cell line, an established *in vitro* model of cartilage differentiation, and the involvement of Sox molecules in such regulation.



## **Experimental procedures**

### *Plasmids and reagents*

The human *fur* promoter luciferase constructs pGL2-P1, pGL2-P1A and pGL2-P1B were generously provided by Dr. Torik A. Y. Ayoubi (University of Leuven and Flanders Interuniversity, Belgium). The plasmids mL-Sox5/pCDNA3, mSox6A/pCDNA3 and hSox9/pCDNA3 were kindly given by Dr. Benoit de Crombrughe (University of Texas, MD Anderson Cancer Center, TX). All mSox6A HMG domain mutants were prepared by site-directed mutagenesis using Quick Change Mutagenesis kit (Stratagene, Cedar Creek, TX), and sequenced. For EMSA, cartridge purity grade oligonucleotides, synthesized by Gibco (Burlington, ON, Canada), were used. Phenylethanesulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin and pepstatin A were from Sigma (Oakville, ON, Canada), poly (dI-dC) was from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada), T4 polynucleotide kinase was from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada), aprotinin and nonidet P-40 (NP-40) were from Roche (Mississauga ON, Canada), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP was from PerkinElmer (Woodbridge, ON, Canada) and acetylated BSA was from Promega (Mississauga, ON, Canada).

### *Cell culture*

ATDC5 cells, generously provided by Dr. Y. Yamada (National Institutes of Health, Bethesda, MD), are clonal mouse carcinoma cells derived from the AT805

cell line (36). They display a number of characteristics of committed chondroprogenitor cells and undergo insulin-induced differentiation that mimics chondrocyte differentiation *in vivo* (37). ATDC5 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle and Ham F-12 (DMEM/F-12; Gibco) medium containing 5% foetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin (Winset Inc., St-Bruno, QC, Canada), 10 µg/ml human transferrin (Gibco) and  $3 \times 10^{-8}$  M sodium selenite (Sigma). For chondrocyte differentiation, ATDC5 were seeded to  $4.0 \times 10^5$  cells in 10 cm petri (Starsted, Montreal, QC, Canada) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, and 10 µg/ml bovine insulin (Sigma) was added to the medium. The culture medium was then switched on day 21 to αMEM (Gibco) containing the same supplements and the CO<sub>2</sub> concentration was shifted to 3% to facilitate cellular hypertrophy and mineralization. The medium was changed every other day for 35 days. Cos7 cells (American Type Culture Collection, ATCC) were maintained in DMEM high glucose (Gibco) containing 10% FBS (Gibco) and 40 µg/ml garamycin (Sabex, Boucherville, QC, Canada). HepG2 cells (ATCC) were maintained in Modified Eagle medium (MEM; Gibco) containing 10% FBS (Gibco) and 40 µg/ml garamycin.

#### *Luciferase Assays*

HepG2 or Cos7 cells were transiently transfected by the CaPO<sub>4</sub> precipitation technique using a mammalian cell transfection kit (Speciality Media Inc., Lavalette, NJ), as previously described (38). Briefly, 24 h prior to transfection, HepG2 and Cos7 cells in complete medium were plated into 6-well plates (Falcon Labware, Mississauga, ON, Canada) using a plating density of 125000 and 100000 cells/well,

respectively. The cells were fed with fresh complete medium for 3-4 h before transfection. Cells were transfected with 2 µg DNA/well for each plasmid. Appropriate amounts of control vectors were used to compensate for potential quenching. After overnight incubation, the cells were lysed and luciferase activity was measured. The results were expressed as fold-induction of luciferase activity.

#### *Semi-quantitative RT-PCR*

ATDC5 cells were grown for up to 35 days and total RNA was extracted according to the Trizol-reagent protocol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Gene expression was analysed by semi-quantitative RT-PCR. RNA aliquots of 2.5 µg were reverse-transcribed in a 20 µl volume with 2 µl of random decamer (Ambion, Austin, TX) and 200 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), using the SuperScript protocol. PCR was performed in a 50 µl volume containing 1 µl of the reverse-transcription reaction with the cDNA, 1 µM gene-specific primers and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Roche). For each primer, the melting temperature (T<sub>M</sub>) was carefully determined to obtain only the gene amplification band of interest. Reaction products were analysed on 1.5% agarose gels in the presence of 2.7 µg/ml ethidium bromide (Sigma) and a digital image of each gel was captured using a gel documentation system (Kodak digital science DC120 camera and software).

The sequences of the specific pairs of primer used for PCR were as follow:  
sense: 5'CGAAGAGCCAAGAGGGACCTGTA3' and antisense: 5'CAGTCACCTC

GCCATCCAACATC3' for furin; sense: 5'GAAGCCATCCGTGGCCAGAT3' and antisense: 5'GACGTCAAAAGACAGCCACT3' for TGF $\beta$ <sub>1</sub>; sense: 5'CAAGTCCA TCCAAGACTTGC3' and antisense: 5'CGTGTCTTGAAGATCTTC3' for PTHrP; sense: 5'GACAGAAAGAGAATCCATTGGT3' and antisense: 5'TTCTTGATCAGCTCTTCCATCT3' for L-Sox5; sense: 5'CTAAGAATGTCT TCCAAGCAAG3' and antisense: 5'AAGTAGTTTTTCCATGCAGGAG3' for Sox6; sense: 5'GTGGCAAGTATTGGTCAA3' and antisense: 5'GAACAGACTCA CATCTCT3' for Sox9; sense: 5'CACACTGGTAAGTGGGGCAAGACCG3' and antisense: 5'GGATTGTGTTGTTTCAGGGTTCGGG3' for type II collagen; sense: 5'CAGGAAAACCTGGACAGCAG3' and antisense: 5'ACCCTTAGCACCATTGACAC3' for type X collagen; sense: 5'AGGAATTGACGGAAGGGCAC3' and antisense: 5'GTGCAGCCCCGGACATCTAAG3' for 18S. The optimal number of cycles and annealing temperatures were determined as being the following: 29 cycles at 60°C for furin, 40 cycles at 56°C for TGF $\beta$ <sub>1</sub>, 38 cycles at 62°C for PTHrP, 40 cycles at 58°C for L-Sox5 and Sox6, 30 cycles at 55°C for Sox9, 32 cycles at 60°C for type II collagen, 34 cycles at 60°C for type X collagen and 25 cycles at 60°C for 18S.

#### *Real-time PCR*

*Fur* and 18S DNA were cloned in pGEMT plasmid (Promega) using the Promega protocol. Both plasmids were amplified in bacteria, extracted with Quiagen midiprep plasmid extraction kit (Quiagen) and diluted from 10<sup>8</sup> to 10<sup>3</sup> copies/ $\mu$ l to perform standard curve amplification. The reaction mixtures for real-time PCR were

optimized for the Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Kirkland, QC, Canada) and consisted of 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.6 µl SYBR green (1/1000) and 0.5 µl of reverse-transcription reaction in a total of 25 µl. The cycling program was: initial denaturation at 95°C for 5 min, 45 cycles of amplification with an annealing temperature of 60°C for 30 sec and a final extension at 72°C for 30 sec. Fluorescence data was acquired at the end of the extension phase. Results were analysed using Rotor-Gene analysis software V.5.0.

#### *Nuclear extracts and EMSA*

HepG2 cells were seeded using a plating density of  $15 \times 10^6$  cells / 15 cm dish (Starsted). Cells were transfected with 30 µg of hSox9/pCDNA3 plasmid described above. After overnight incubation, nuclear extracts were prepared as described (39). Nuclear extracts (10 µg) were analysed by EMSA as described (40). Protein-DNA binding reactions were carried out with 40000 cpm of oligonucleotide probe (<sup>32</sup>P-end-labeled with T4 kinase) in Sox9-binding buffer (20 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 10% vol/vol NP-40) supplemented with 30 µg acetylated BSA and 0.75 µg poly (dI-dC) before addition of the labelled probe. For supershift experiments, binding reactions were conducted in the presence of a specific Sox9 antibody (Santa Cruz Biotchnology, Santa Cruz, CA) or isotype-matched antibody (Sigma) (30 min on ice) before addition of <sup>32</sup>P-labeled probes. The sequences of the sense strands of the oligonucleotides used for EMSA were as follows: 5'-CCAGCATTGTTCTCCA GTTCCAGTT-3' (P1A AB sites), 5'-CCAGTTAAAAGCCTCTTAAAAACAGTT -3' (P1A AB sites mut), 5'-CCAGTTAAAACCTCCAGTTTCCAGTT-3' (P1A A

site mut), 5'-C CAGCATTGTTTCCTCTTAAAAACAGTT-3' (P1A B site mut), 5'-GGTTTTCAAAGG CGCCTTGTTTGCC-3' (COLL11A2) (34).

#### *Western blot analysis*

Total cell lysates and immunoblotting were performed as previously described (41). The nuclear extracts were isolated as described above. The membranes were probed overnight with a rabbit anti-Sox9 antibody (Santa Cruz) followed by peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma). Blots were developed using the ECL western blotting detection reagent (Amersham).

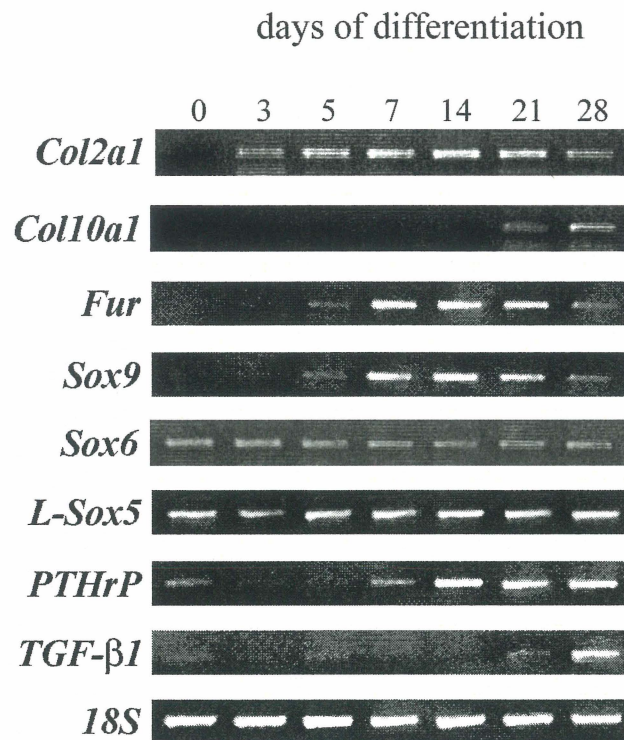
## **Results**

#### *Modulated expression of furin in differentiating ATDC5 cells*

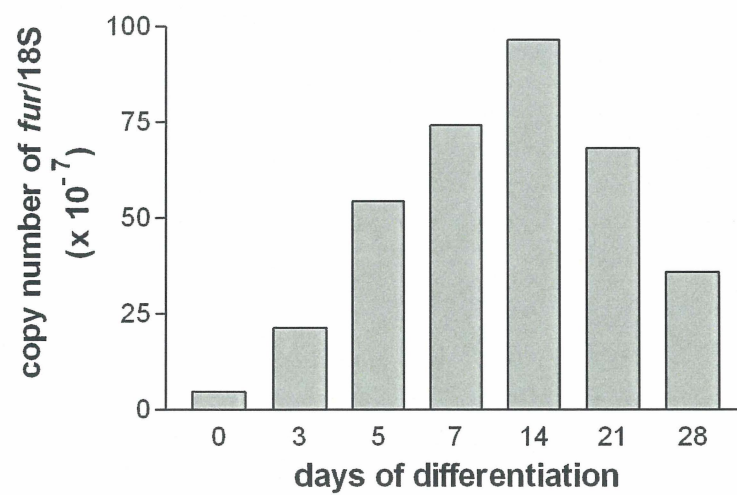
The proprotein convertase furin is ubiquitously expressed in vertebrates and is involved in the processing of a variety of substrates, some of which being involved in chondrogenesis. To gain insights into the regulation of the *fur* gene (encoding furin) during chondrogenesis, we used the mouse prechondrogenic ATDC5 cell line, an established insulin-induced *in vitro* model of cartilage differentiation (37). As demonstrated in Fig.1A, collagen type *2a1* mRNAs were expressed in ATDC5 cells from day 3 onwards, concomitant with the chondrocyte being elongated and forming cellular condensation (42). Gene expression for the type *10a1* collagen was detectable during both nodule formation and hypertrophic stages (days 21-28) (37). In

**Figure 1. Expression of Furin and Sox during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells.** Cells were plated at  $4.0 \times 10^5$  cells in 10 cm dishes and maintained in DMEM/F-12 containing 10% FBS and ITS. Total RNA was extracted at the indicated days of culture. A. Reverse-transcribed cDNAs were amplified by PCR with gene-specific primers. Aliquots of the PCR products were resolved on 1.5% agarose gels. B. *Fur* mRNA levels were measured by real-time PCR, normalized to 18S ribosomal RNA and quantified as described in Experimental Procedures. Results are representative of three independent experiments.

**A**



**B**





addition, Sox mRNAs were first detected at the condensation stage (day 5), with peak expression at the nodule formation stage (days 7-14), followed by gradual decline in expression levels at the prehypertrophic (day 21) and hypertrophic (day 28) stages. In contrast, L-Sox5 and Sox6 mRNAs were expressed throughout the ATDC5 differentiation process. The observed pattern of expression of the chondrogenic differentiation marker type *2a1* collagen, type *10a1* collagen and Sox9 are in agreement with previously published data (36,37,42).

Analysis of furin mRNA levels revealed a similar Sox9 expression pattern, with absence of mRNA detection at the pre-condensation stage, peak levels at the nodule formation stage, and gradual decline thereafter. The furin substrate PTHrP closely followed the furin expression pattern, while TGF $\beta$ 1 was mostly expressed at the more differentiated hypertrophic stage. Real-time PCR analysis was performed to quantitatively measure furin mRNA expression levels. As observed in Fig. 1B, the number of furin gene copies detected correlated with the expression pattern obtained with the semi-quantitative PCR assay. Taken together, our results indicate that ATDC5 cell culture differentiate in a time-dependent fashion in the presence of insulin, as previously reported. They also indicate that the expression of furin and Sox9 genes are co-modulated during the ATDC5 differentiation process, suggesting a relationship between Sox9 and furin expression.

### *Sox9 acts to amplify fur expression*

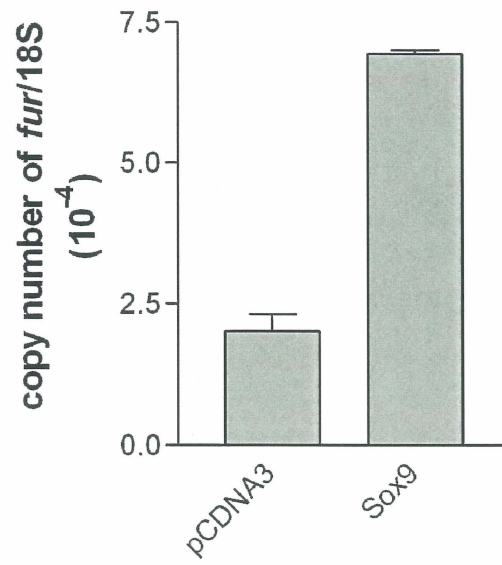
To determine whether Sox9 modulates endogenous *fur* gene expression, Cos7 cells, which display undetectable endogenous levels of Sox9 (data not illustrated), were transfected with pCDNA3-encoding human Sox9 expression vector (pCDNA3-hSox9), followed by real-time PCR analysis of *fur* transcripts. As indicated in Fig. 2A, Sox9 transfection induced the expression of furin mRNAs with 1.6, 2.3 and 4.3 fold-increases when using 2 µg, 5 µg and 10 µg of transfected plasmids, respectively. These results indicate that the transcription factor Sox9 positively regulates furin mRNA levels in cells.

### *Differential sensitivity of the fur promoters to the transcription factor Sox9*

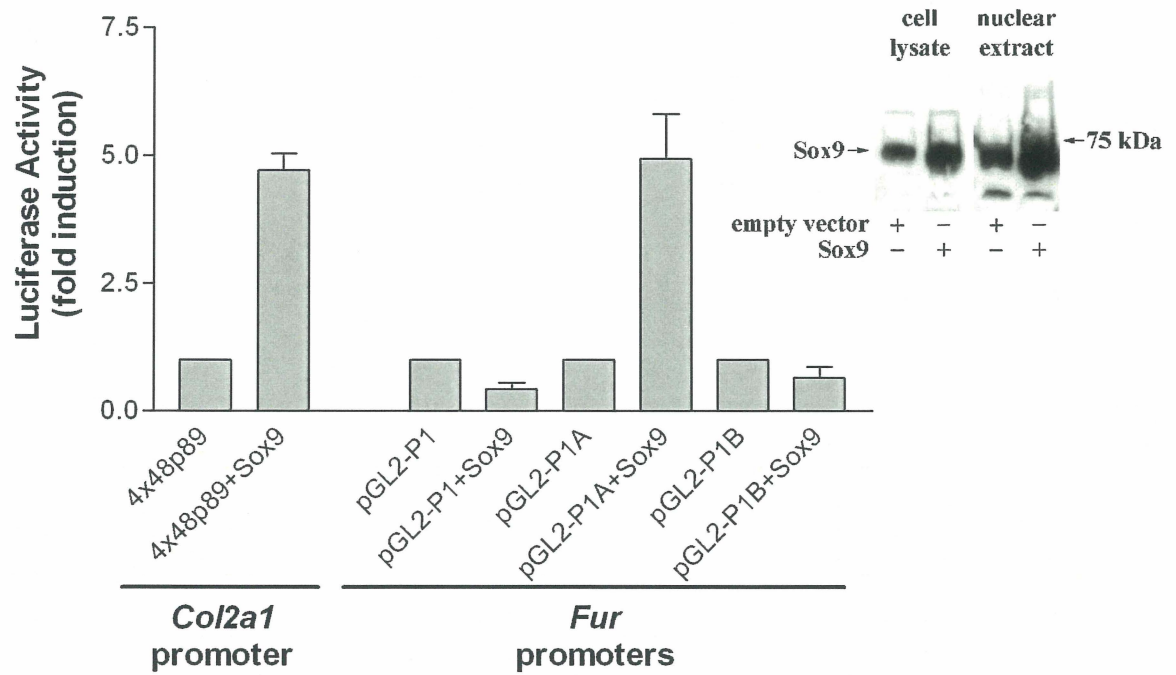
Previous reports have demonstrated that *fur* transcription was regulated by 3 promoters, namely P1, P1A and P1B (43). To determine whether Sox9 directly impact furin transcription, we measured the effect of Sox9 expression on the transcriptional activity of each of the three furin promoters in HepG2 cells. This cell line has been previously used to study the impact of various transcription factors/signalling molecules on furin gene expression (41). As shown in Fig. 2B, HepG2 cells expressed moderate levels of Sox9 protein. Transient transfection of a Sox9-encoding plasmid resulted in a marked increase in Sox9 protein levels. For furin promoter assays, HepG2 cells were transiently transfected with the furin luciferase reporter constructs pGL2-P1, pGL2-P1A and pGL2-P1B or the *Col2a1* reporter construct 4X48p89*Col2a1*, with or without pCDNA3-hSox9, or an empty

**Figure 2. *Sox9* transactivates the human *fur* gene in *Cos7* and *HepG2* cells.** *A.* *Cos7* cells were transfected with pCDNA3-h*Sox9* and furin mRNA levels were measured by real-time PCR, normalized to 18S ribosomal RNA, and quantified as described in Experimental Procedures. A typical experiment out of three is represented. *B.* *HepG2* cells were cotransfected with 2 µg of pGL2-P1, pGL2-P1A, pGL2-P1B or 4x48p89Col2a1, and 2 µg of pCDNA3-h*Sox9* or control pCDNA3. Luciferase activities were determined and expressed as fold-induction relative to unstimulated (-*Sox9*) promoters. Data are expressed as the mean ± SEM; n = 5. (Insert) *HepG2* cells were transfected with pCDNA3-h*Sox9* or with empty vector. Whole cell lysates and nuclear extracts were analysed by Western blotting with anti-*Sox9* antibodies.

**A**



**B**

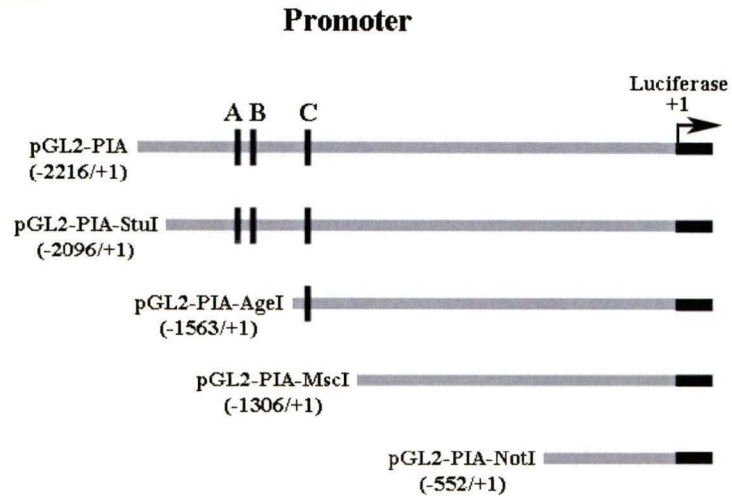
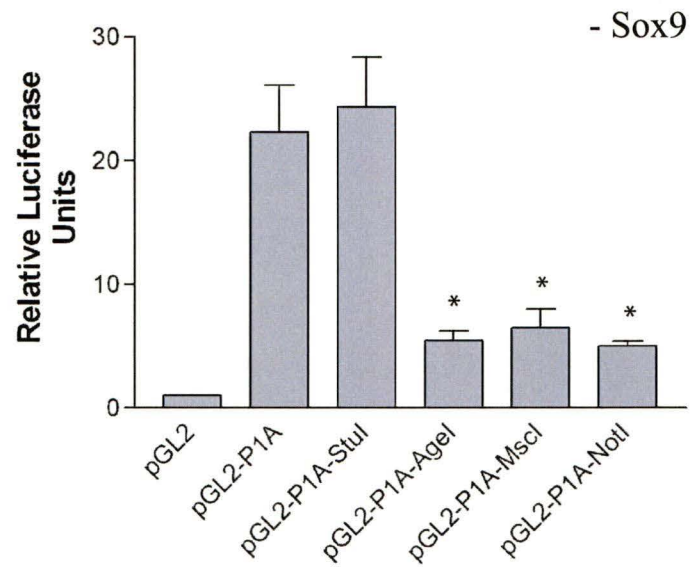
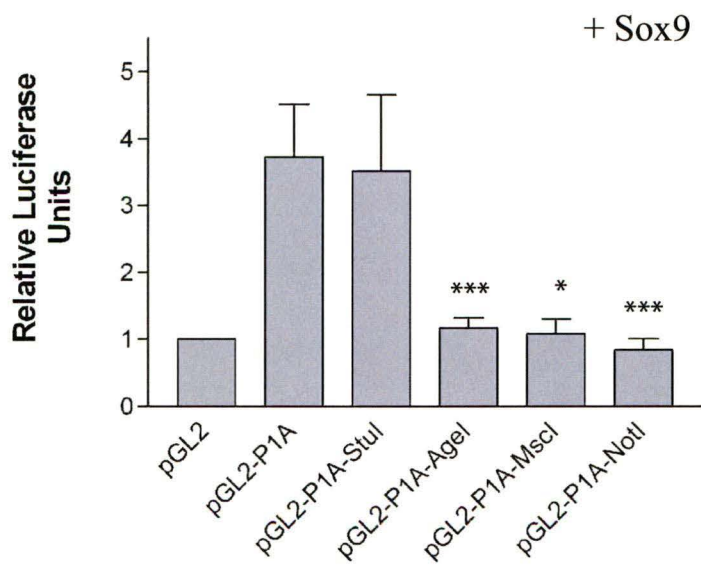


vector as a control. In cells transfected with Sox9, whereas the P1 or the P1B promoters were not transactivated by the transcription factor, an approximately 5-fold increase in P1A transactivation was observed (Fig. 2B). Surprisingly, the increase in P1A promoter transactivation by Sox9 was similar to the one obtained with a luciferase construct containing 4 tandem repeats of the 48 bp *Col2a1* promoter, a strong chondrocyte-specific enhancer known to be activated by Sox9 (44). These results suggested that the *fur* gene is transactivated by Sox9 and that strong Sox regulatory regions reside within the furin P1A promoter.

#### *Deletion analysis of the furin P1A promoter*

To delineate the P1A promoter region(s) implicated in Sox9 regulation, 5' deletion constructs were co-transfected into HepG2 cells along with the pCDNA3-hSox9 expression vector. As shown in Figures 3B and 3C, both basal and Sox9 P1A responses were retained up to position -2096. Further deletions to position -1563 resulted in a sharp decrease in basal (Fig. 3B) as well as Sox-9 transactivation (Fig. 3C) capabilities near to values obtained with a basic pGL2 promoter. We therefore conclude that Sox9 responsive elements reside within the -2096 to -1563 promoter region of the P1A furin promoter.

**Figure 3. Basal and Sox9-induced transactivations of P1A 5' deletion constructs.**  
A. Schematic representation of consensus Sox recognition sequences within the *fur* P1A promoter fragments shortened in 5' using endogenous *StuI*, *AgeI*, *MscI*, *NotI* restriction sites. Positions are relative to the 3' end of the P1A promoter sequence. B. HepG2 cells were cotransfected with either 2 µg of pGL2-P1A or individual 5' deletion constructs alone or C. in the presence of pCDNA3-hSox9 or empty pCDNA3. After 48 h, basal and Sox9-induced luciferase activities were determined and expressed as relative luciferase units (RLU) relative to unstimulated pGL2 values. Data are expressed as the mean ± SEM; n = 8. \*, P < 0.05 ; \*\*\*, P < 0.0001 by unpaired Student's test.

**A****B****C**

*Functional analysis of Sox9 binding sites within the -2096 to-1563 P1A promoter sequence*

The common Sox9 binding site was previously shown to consist of an heptameric AT-rich DNA sequence, although recent data highlighted the presence of a more complex architectural binding sequence within the 5'UTR of several Sox9-induced genes. Such motif consists of two Sox recognition sites, separated by 3 or 4 nucleotides and facing each other to allow binding of Sox9 as a dimer (34). Analysis of the Sox9 sensitive -2096 to-1563 promoter sequence revealed the presence of 3 putative Sox recognition sequences, designated A-C (Fig. 4A). Sites A and B have features of a paired Sox site, oriented toward each other and spaced by 4 nucleotides, whereas the C site harbours characteristics of a single heptameric Sox sequence located 255 bp downstream from the A-B site. To define more precisely the role of these putative Sox-binding sites in P1A transactivation, point mutations were introduced into sites A, B and C, resulting in four distinct mutants: pGL2-P1A-mutA, pGL2-P1A-mutB, pGL2-P1A-mutAB and pGL2-P1A-mutC (Fig. 4A). Mutations of site A, and more importantly site B, decreased Sox9-induced promoter activity, while mutation of both A and B sites resulted in only slight additional inhibition, suggesting that these two sites act in a cooperative manner (Fig. 4B). In contrast, mutation of the C site did not significantly reduce Sox9 stimulation, further suggesting that this site is dispensable for Sox9 response of the P1A promoter.



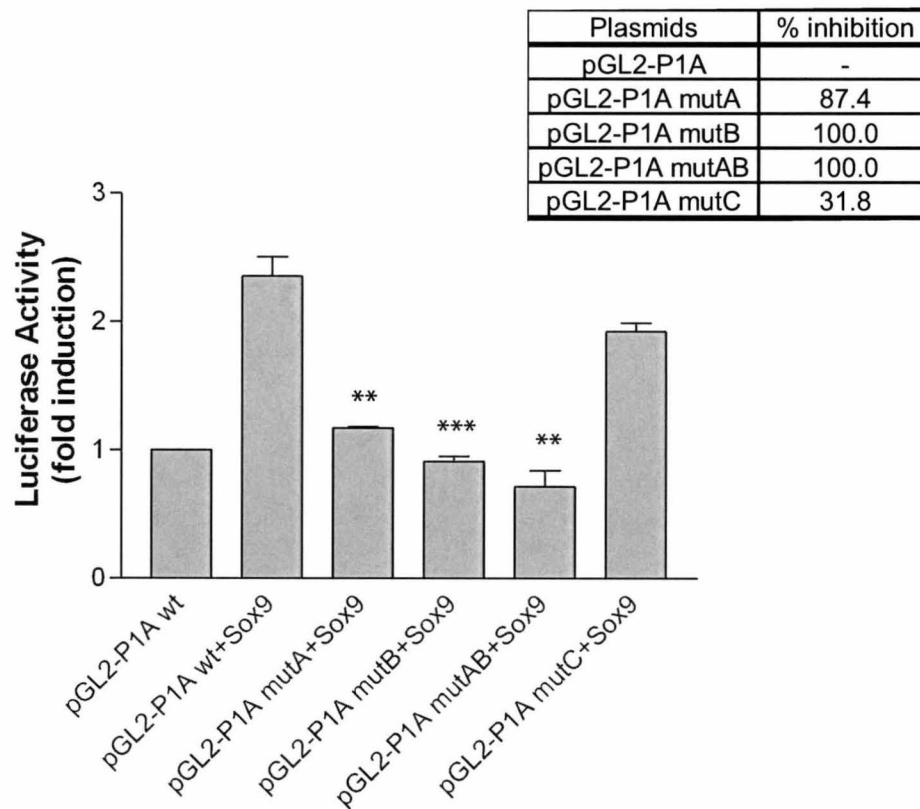
**Figure 4. *Functionality of Sox heptameric sequences within the P1A promoter.*** *A.* The nucleotide sequences of the putative Sox sites within the *fur* P1A promoter are depicted. Positions are relative to the 3' end of P1A. The three putative SOX/Sry-binding sites are designated A to C. Sequences of the mutated fragments are shown below. Only mutated nucleotides are indicated, unchanged nucleotides are represented by dots. *B.* HepG2 cells were cotransfected with 2 µg of wild type or Sox-mutated pGL2-P1A and 2 µg of pCDNA3-hSox9 or empty plasmid as control. Luciferase activities were determined and values expressed as fold-induction relative to unstimulated pGL2 values. Data are presented as the mean ± SEM; n = 3. \*, P< 0.05; \*\*, P< 0.001; \*\*\*, P< 0.0001; by unpaired Student's test.

**A**

-1856                      site A                      site B                      -1814  
 pGL2-P1A wt            5'gaggaccagc**attgtt**cctc**cagtttc**cagttcttgcagtg 3'  
 pGL2-P1A-mutA            .....**cggc**.....  
 pGL2-P1A-mutB            .....**tggc**.....  
 pGL2-P1A-mutAB            .....**cggc**.....**tggc**.....  
  
 -1584                      site C                      -1555  
 pGL2-P1A wt            5'gacagtgatac**atcaaag**gtacttaaagg 3'  
 pGL2-P1A-mutC            .....**c**..**tg**.....

Sox recognition sequence: 5'c(a/t)ttg(a/t)(a/t)3'  
 3'g(a/t)aac(a/t)(a/t)5'

**B**

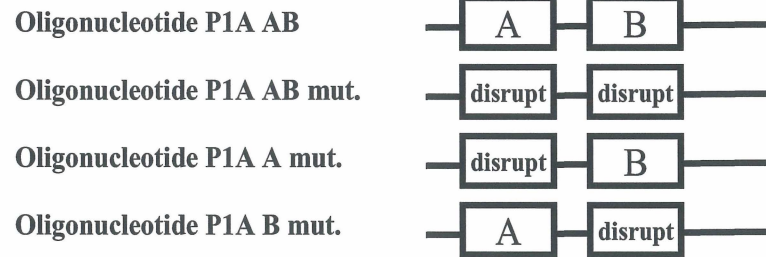


To determine whether the tandem Sox sequence (A,B sites) could bind Sox9, we performed electrophoretic motility shift assays (EMSA) with a 27-bp probe containing the wild-type A and B (oligonucleotide P1A-AB, Fig. 5A). Three retarded bands (C1, C2, and C3) were obtained with nuclear extracts from Sox9 transfected HepG2 cells (Fig. 5B). All three complexes were effectively competed using a cold oligonucleotide featuring a consensus Sox9 sequence (34) (data not shown). In contrast, mutated oligonucleotides with 3-bp substitutions within the A and B motif (P1A-AB mut) were unable to form complexes (Fig. 5, lanes 4-6). In addition, a Sox9-specific antibody supershifted into 2 slower migrating bands, the C1, C2 and C3 complexes (Fig. 5B, lane 3), corresponding to monomeric Sox9, dimeric Sox9 and Sox9-binding factor complexes (28, 34, 45-48) respectively, whereas an isotype-matched control antibody was inefficient (Fig. 5B, lane 2). Therefore, Sox9 is a component of the C1, C2 and C3 complexes. Taken together, these results show that the Sox consensus sequences located between positions -1856 to -1814 of the furin P1A promoter specifically interact with Sox9.

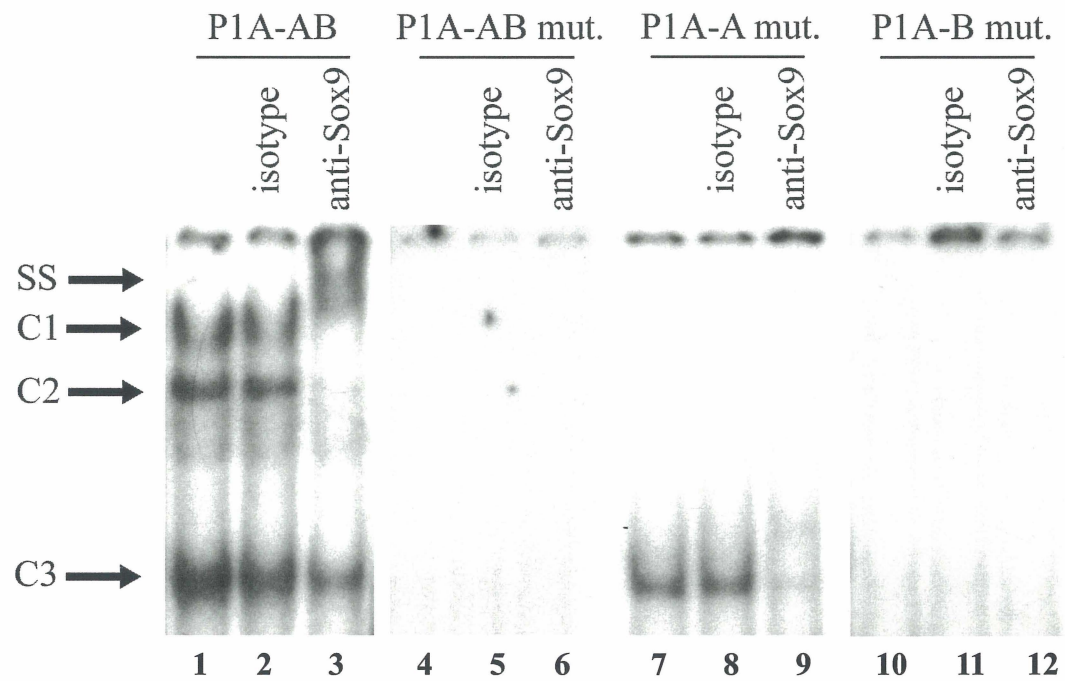
To study the relative contribution of site A and site B in Sox 9 binding, the A and B sites of the P1A-AB oligonucleotide were individually mutated. As demonstrated in Fig. 5B, disruption of the A site (P1A-Amut; lanes 7-9) resulted in the formation of only one high mobility complex, corresponding to the monomeric Sox9 DNA complex (C3), whereas mutations in either the B site (P1A-Bmut; lanes 10-12) or both A and B sites (P1A-ABmut; lanes 4-6) prevented the formation of all Sox9 complexes. These results suggest that Sox9 binds to the B site as a monomeric

**Figure 5. *Sox9* specifically interacts with the Sox/Sry-binding site A and B of the human *fur* P1A promoter.** A. Schematic representation of oligonucleotides used in EMSA. The A and B letters refer to Sox/Sry-binding sites in the P1A sequence of *fur* shown in Fig. 4A. B. Nuclear extracts from HepG2 cells transfected with pCDNA3-hSox9 were incubated 10 min at room temperature in binding buffer with <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide P1A-AB, P1A-ABmut, P1A-Amut and P1A-Bmut. Specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold oligonucleotide Col11a2, data not illustrated) or by including antibody to Sox9 or rabbit IgG isotype-matched controls. SS indicates supershifted complexes; C1, C2 and C3 are Sox9-specific complexes.

**A**



**B**

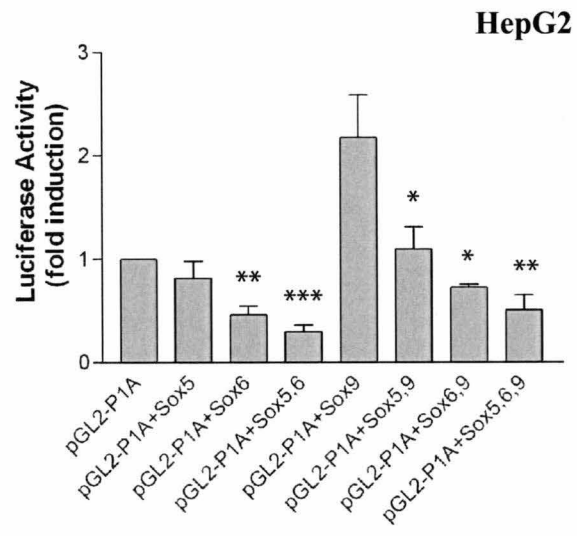
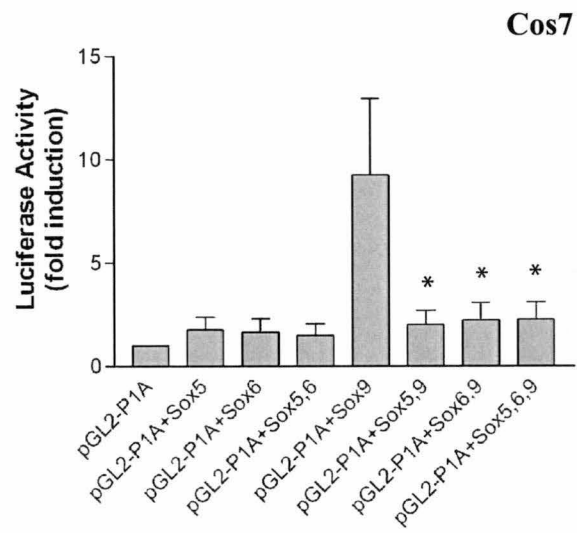
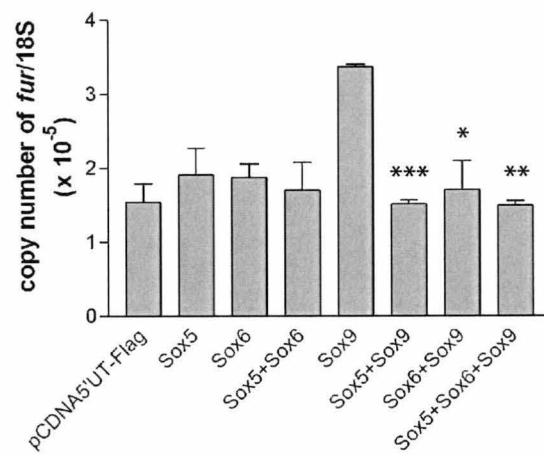


form whereas the A site does not bind any Sox9 complexes. In addition, both A and B sites act in a cooperative manner for the binding of the higher molecular weight C2 (dimeric Sox9) and C1 (Sox9-binding factor) complexes.

*L-Sox5 and Sox6 act as negative regulators of Sox9-induced fur expression*

Sox9 cooperates with L-Sox5 and Sox6 to regulate the expression of various genes, including the type II collagen and the cartilage link protein (*CRTL1*) (26, 49, 50). To provide insights into the possible cooperation between Sox6 and L-Sox5 proteins in the regulation of the *fur* gene, endogenous Sox9 expressing HepG2 cells or Sox9 negative Cos7 cells were co-transfected with pGL2-P1A and the three Sox-encoding plasmids (pCDNA3-L-Sox5, pCDNA3-Sox6, pCDNA3-Sox9), alone or in combination, and luciferase activity was measured. As shown in Fig. 6A, expression in HepG2 cells of individual L-Sox5 or Sox6 or their combination resulted in 18.2%, 57.3% and 70.4% reduction respectively, of basal P1A transcription activity, an effect that was statistically significant with Sox6 alone or L-Sox5 and Sox6 combinations. Such basal inhibitory impact of L-Sox5, Sox6 or their combination was not observed with the Sox9-negative cell line Cos7 (Fig. 6B), suggesting an interrelationship between L-Sox5, Sox6 and endogenously expressed Sox9 in HepG2 cells. Supporting this, co-transfection of L-Sox5, Sox6, or their combination, with Sox9 blunted Sox9-induced P1A transactivation in both HepG2 and Cos7 cells (Fig. 6A, 6B). Data from real-time PCR analysis of *fur* transcripts in Cos7 cells demonstrated similar action of L-Sox5 and Sox6 in reducing Sox9-induced

**Figure 6. Negative regulation of the fur P1A promoter by L-Sox5 and Sox6 in HepG2 and Cos7 cells.** A. HepG2 and B. Cos7 cells were cotransfected with 2  $\mu$ g of pGL2-P1A and either 2  $\mu$ g of pCDNA3-hSox9, pCDNA3-mL-Sox5, pCDNA3-mSox6 or pCDNA3 empty plasmid for 48 h. Luciferase activities were determined and expressed as fold-induction relative to pGL2-P1A activity. Percentages of inhibition of pGL2-P1A activity with L-Sox5 and/or Sox6 relative to control are given. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM; n = 4. C. Cos7 cells were cotransfected as previously described and total RNA was extracted and reverse-transcribed. Furin mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to 18S ribosomal RNA. The results shown are representative of three independent experiments. \*, P< 0.05; \*\*, P< 0.001; \*\*\*, P< 0.0001 by unpaired Student's test.

**A****B****C**



expression of furin mRNA. Taken together, these results indicate a negative cooperation between L-Sox5, Sox6 and Sox9 for both furin P1A transactivation and furin mRNA expression.

It is known that Sox DNA-binding requires the presence of highly conserved amino acids within the High-mobility group (HMG) domain (51). In particular, phenylalanine at position 12 is a key residue within the hydrophobic core that interacts with Sox-consensus DNA sequence. To define whereas the negative cooperation between Sox6 and Sox9 involves direct binding of Sox6 to DNA, we tested the impact of two previously characterized Sox-HMG-box mutants, namely Sox6F12Y and Sox6Y74A, on Sox9-induced transactivation (Fig. 7A). Previous characterization of these mutants indicated that Sox6F12Y and Sox6Y74A exhibited 1.8% and 44.5%, respectively, of DNA-binding capacity to a consensus Sox motif compared to Sox6wt (51). Co-transfection of various concentrations of Sox6wt-encoding plasmid together with Sox9 resulted in a concentration-dependent inhibition of Sox9 induced transactivation, with a 94% inhibition obtained with the highest concentration of plasmid (4 µg) used. In contrast, the Sox6F12Y mutant, which displays very low DNA-binding capacity, failed to diminish Sox9-induced P1A transactivation, whereas the intermediate DNA-binding affinity mutant, Sox6Y74A, had a milder impact, with a 71% inhibition achieved. Together, these results suggest that the repressive effect of Sox6 needs direct binding of its HMG box to DNA.

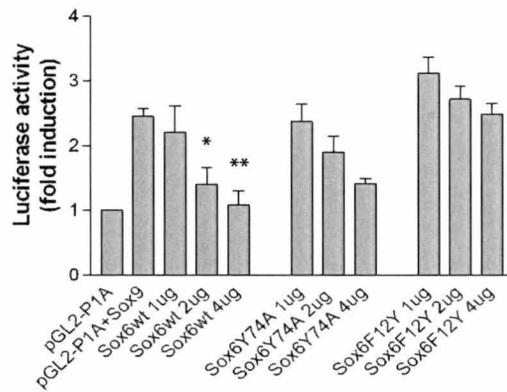
**Figure 7. Impact of Sox6 mutants on Sox9-induced P1A transactivation in HepG2 cells.** *A.* Amino acid sequence alignment of zfSox9 and mSox6 HMG domains. (+) denotes residues with the same hydrophobicity and letters denote conserved residues. Arrows show substitution positions. *B.* HepG2 cells were cotransfected with 2 µg of pGL2-P1A, 2 µg of pCDNA3-hSox9 and plasmids encoding wtSox6, Sox6Y74A or Sox6F12Y for 48 h. Luciferase activities were determined and expressed as fold-induction relative to pGL2-P1A activity. Data are expressed as the mean ± SEM; n = 9. *C.* Percentage inhibition of Sox9-induced transactivation with wtSox6 or Sox6 affinity mutants. Data are presented as percent inhibition of Sox9-induced pGL2-P1A activation. \*, P< 0.05; \*\*, P< 0.001; \*\*\*, P< 0.0001; by unpaired Student's test.

**A**

**Sequence-specific HMG**

|               |  |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------|--|----|----|----|----|----|----|----|----|
|               | 1  | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| <b>zfSox9</b> | NKPHVKRPMNAFMVWAQAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLENEVEKRPFVEEAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKS |    |    |    |    |    |    |    |    |
|               | ++PH+KRPMNAFMVWA+ RRK+ +P +HN+ +SK LG W+ ++ EK+P+ EE RL H + +P+YKY+PR +++          |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>mSox6</b>  | SEPHIKRPMNAFMVWAKDERRKILQAFPMHNSNISKILGSRWKSMSNQEKQPYEEQARLSKIHLEKYPNIKYKPRPKRT    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|               |  | ↑↑ |    |    |    |    |    |    | ↑↑ |
|               |  | Y  |    |    |    |    |    |    | A  |

**B**



**C**

| Plasmids     | % inhibition |
|--------------|--------------|
| Sox6wt 1ug   | 16.8         |
| Sox6wt 2ug   | 72.5         |
| Sox6wt 4ug   | 94.2         |
| Sox6Y74A 1ug | 5.6          |
| Sox6Y74A 2ug | 38.6         |
| Sox6Y74A 4ug | 71.4         |
| Sox6F12Y 1ug | -45.5        |
| Sox6F12Y 2ug | -18.4        |
| Sox6F12Y 4ug | -2.5         |

## Discussion

The mammalian convertase furin is responsible for the proteolytic activation/maturation of critical chondrogenesis mediators, such as PTHrP, BMPs, insulin-like growth factor receptor and TGF $\beta$ , which are synthesized by chondrocytes. To date, however, information on the expression/regulation of the *fur* gene in these cells is lacking. We demonstrated herein that during differentiation of the chondrogenic cell line ATDC5, *fur* gene RNAs were expressed in a similar pattern as Sox9 mRNAs. Both genes showed peak expression during the nodule formation stage, with gradual decline at the prehypertrophic and hypertrophic stages, where the expression of both Sox9 and *fur* mRNAs was barely detectable. We also showed that Sox9 transactivates the *fur* P1A promoter and this transactivation depends on a paired Sox site located within the distal region of the promoter. Our work provides a mechanism by which furin is regulated during chondrogenesis and adds furin to the growing list of genes modulated by Sox9, a key regulator of chondrogenesis.

Real-time PCR results demonstrated that Sox9 overexpression positively regulates furin mRNA levels. As described by Ayoubi *et al.*, three alternative promoters direct *fur* expression (43). Promoter P1 was described as being of the inducible type. It has both TATA and CCAAT elements in the proximal promoter region, and was reported to be *trans*-activated by the transcription factors C/EBP, GATA-1/FOG, SMADs and HIF-1(41, 52, 53). This feature is relevant to the inducible nature of the P1 promoter and to its relatively high level of expression

during hepatocyte and megakaryocyte development (52, 54). On the other hand, P1A and P1B promoters possess known characteristics of housekeeping gene promoters as they are GC-rich and contain several Sp1 binding sites. So far, the exact function of these two promoters remains unknown. Herein, we demonstrate that among the three furin promoters, only P1A is transactivated by Sox9, suggesting for the first time that one of the roles of the P1A promoter is to drive furin expression during Sox9-regulated developmental processes such as cartilage/bone formation.

Promoter deletion and sequence analysis revealed 3 putative heptameric Sox sequences (designated A to C sites) within the Sox9 sensitive P1A promoter region. Further study of the Sox9-inducible P1A promoter indicated that point mutation within the A and B sites abolished Sox9 responsiveness whereas mutations within the downstream C site had no impact, indicating that Sox9 P1A responsiveness relies on the presence of intact A/B sites. Whereas the dispensable C site corresponds to the minimal consensus Sox sequence, the Sox9-sensitive region contains one paired Sox binding site that consists of one consensus site (the A site) and one non-consensus site (the B site) facing each other and separated by a few base pairs (4 bp). This particular spacing and inverted orientation are characteristic of cooperative binding involving dimers of Sox proteins (34). The importance of binding cooperativity for *fur* regulation was confirmed by studies indicating that mutations of either the A or B sites abolished Sox9 responsiveness of the P1A promoter.

As selected members of the Sox family, Sox9 does not form homodimers in solution. The dimerization domain appears instead to possess a specific configuration that permit dimerization of the molecule only upon binding to appropriate DNA-binding sites (55), suggesting that Sox9 could bind to either the A, the B or both DNA sites, resulting in the formation of homodimeric molecules. In EMSA assay, mutation of the A site significantly altered the mobility shift pattern resulting in the detection of only one lower band that corresponds to the binding of the monomeric form of Sox9 to the intact B site. Interestingly, mutations of the B site led to a complete loss of both monomeric or dimeric Sox9 binding to DNA. Thus, even though the B site corresponds to a less conserved core consensus Sox sequence, this site appears to bind monomeric Sox9 molecules with better affinity than the consensus A site. This apparent dichotomy might be explained by previous studies indicating that differences in Sox DNA-binding affinity was observed when nucleotides flanking the core consensus Sox sequence varies, with a Sox9 nucleotide preference being 5' AG (or TC) and 3' GG (or CC ) (25). The presence of 5' TC and 3' CC flanking the B site sequence might explain the observed binding preference of monomeric Sox9 to this particular site.

The observation that Sox9 must function as a dimer to transactivate the *fur* gene is consistent with results published regarding Sox10, the Sox protein member most closely related to Sox9. Both Sox10 and Sox9 have, N-terminal to their HMG domain, a DNA-dependent dimerization domain essential for cooperative binding to inverted paired DNA-binding sites, with spacing and orientation similar to the ones

found in the *fur* P1A promoter (28, 34, 46). The interaction between Sox10 dimers and DNA differs from that of Sox10 monomers, as it resulted in a reduction of the protein's off-rate as well as in a marked increase in protein-induced DNA-bending angle (56). The ability of Sox dimers to cooperatively induce DNA-bending might be particularly important in the architectural context of the furin P1A promoter. Indeed, the Sox9 regulatory region is within the far distal region of the promoter : DNA-bending by Sox9 dimers may promote the interaction with components of the transcription machinery and ubiquitous transcription factors bound to proximal promoter elements. The fact that several putative binding sites for the transcription factor Sp1 are found within the P1A proximal region supports this possibility. However, additional studies are needed in order to identify the putative cofactor-binding sites present on the furin P1A promoter.

The Sox factors, L-Sox5, Sox6 and Sox9, are essential for normal skeletogenesis and cooperatively activate the expression of various genes including Col2a1(21, 22) and matrilin-1 (57). This enhancing effect is however not consistent among all cartilage genes. For example, Sox9-mediated transcription of Col9a1 gene, a cartilage gene expressed at a differentiation stage other than Col2a1 or matrilin-1, is repressed by L-Sox5 and Sox6, suggesting that the regulatory mechanism of the Sox trio will differ between genes and/or differentiation stages (26, 56, 58). Results from our study indicate a negative cooperation between L-Sox5, Sox6 and Sox9 for the transactivation of the *fur* gene. Such repression involves direct binding of Sox6 to DNA, since Sox6 HMG-box mutants exhibited a repressive activity that corresponds

to their DNA-binding affinity. It is known that the Sox protein family members all share affinity for the same heptameric consensus sequence (A/T)(A/T)CAA(A/T)G (24, 25). One may speculate that Sox6 and possibly L-Sox5 competes with Sox9 for binding at either or both of the Sox sites in a pair, thereby exerting a negative regulatory effect. Results from EMSA experiments using Sox6 overexpressing Cos cells support this possibility, since Sox6 specifically binds the Sox9 A/B enhancer element (data not shown). Therefore, direct competition between Sox9, Sox6 and L-Sox5 at the A/B enhancer appears to prevent Sox9 binding and thereby enhancer capability. In the ATDC5 differentiation system, Sox5 and Sox6 are expressed similarly throughout the chondrocyte differentiation pathway, while Sox9 and furin are mostly expressed during the nodule formation stage. It is therefore possible that at this differentiation stage, the increase in Sox9 concentration will favour binding of this particular Sox family member to the A/B enhancer.

In addition to the *fur* gene shown in this study, Sox9 binds as a dimer to the regulatory region of several cartilage collagen genes, including Col2a1 (21, 22), Col11a2 (33, 34), Col9a2 (32), and Col27a1 (59) as well as other non-collagen cartilage genes including aggrecan (35, 46), CD-RAP (46), and matrilin-1 (57). As opposed to this, the same transcription factor was reported to bind as a monomer to *cis* elements found in the regulatory region of the sex-determining genes SF1 and vanin-1 (60). The importance of Sox9 dimerization for differential regulation of Sox9-responsive sex and cartilage genes was further confirmed with the identification of patients with mutations that disrupt the dimerization domain of



Sox9. These mutations resulted in a form of campomelic dysplasia characterized by cartilage abnormalities but not sex reversal, indicating that dimerization is required for the regulation of chondrogenesis but not sex-determination genes (28, 46). Consistent with this, our study indicating the requirement of a paired Sox site (A/B site) for *fur* regulation may explain why this enzyme is regulated during chondrogenesis while a lack a modulation was observed during testis development (61).

During rat embryogenesis, *in situ* hybridization studies have revealed differential spatial and temporal expression of the *fur* gene, with higher levels of mRNA detected in the heart and liver at early developmental stages. In mid- and late gestational stages, furin is more widely distributed in the peripheral tissues with abundant expression in all precartilaginous bodies of skeletogenic centers, such as the cartilage primordium of cephalic bones, vertebral bodies, ribs, and femurs (15). This pattern of embryonic expression coincides both in time and localization, with the expression of the critical chondrogenesis mediators and furin substrates PTHrP (62), BMPs (63) and TGF $\beta$ 1 (64). It has been firmly established that TGF- $\beta$  and BMP-4 are essential for skeletal development since they regulate the endochondral pathway, whereas BMP-4 also controls the rate of cartilage formation and chondrocyte differentiation (65, 66). *In vitro*, TGF $\beta$  enhances the expression of collagen type II and aggrecan by isolated chondrocytes as well as cartilage explants (7, 8, 65, 66). PTHrP, in turn, controls the rate of hypertrophic chondrocyte differentiation. In the growth plate, PTHrP inhibits the rate at which chondrocytes, present in columns of

proliferating cells, exit the cell cycle and are converted to post-proliferative hypertrophic chondrocytes (4, 6, 67). Therefore, the proper expression/regulation of furin in chondrocytes would likely to be important for the bioavailability of mediators involved in chondrocyte differentiation.

## References

1. Stokes, D. G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., and Jimenez, S. A. (2001) *Biochem J* **360**, 461-470
2. Shum, L., and Nuckolls, G. (2002) *Arthritis Res* **4**, 94-106
3. Kronenberg, H. M., and Chung, U. (2001) *Novartis Found Symp* **232**, 144-152; discussion 152-147
4. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., and Tabin, C. J. (1996) *Science* **273**, 613-622
5. Karaplis, A. C., and Goltzman, D. (2000) *Rev Endocr Metab Disord* **1**, 331-341
6. Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M., and Mulligan, R. C. (1994) *Genes Dev* **8**, 277-289
7. Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E. H., LaBorde, J., Sheehan, D. M., Derynck, R., and Moses, H. L. (1997) *J Cell Biol* **139**, 541-552
8. Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C., and Deng, C. X. (2001) *J Cell Biol* **153**, 35-46
9. Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Bussemakers, M. J., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F. M., Bloemers, H. P., and Van de Ven, W. J. (1986) *Mol Biol Rep* **11**, 117-125
10. Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Leunissen, J. A., Onnekink, C., Bloemers, H. P., and Van de Ven, W. J. (1986) *EMBO J* **5**, 2197-2202
11. Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M. G., Lazure, C., Mbikay, M., and Chretien, M. (1991) *Mol Endocrinol* **5**, 111-122
12. Seidah, N. G., Mattei, M. G., Gaspar, L., Benjannet, S., Mbikay, M., and Chretien, M. (1991) *Genomics* **11**, 103-107
13. Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimpel, K. R., and Thomas, G. (1992) *J Biol Chem* **267**, 16396-16402
14. Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., and Nakayama, K. (1991) *J Biol Chem* **266**, 12127-12130
15. Zheng, M., Streck, R. D., Scott, R. E., Seidah, N. G., and Pintar, J. E. (1994) *J Neurosci* **14**, 4656-4673
16. Moldovan, F., Pelletier, J. P., Mineau, F., Dupuis, M., Cloutier, J. M., and Martel-Pelletier, J. (2000) *Arthritis Rheum* **43**, 2100-2109
17. Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., and Schedl, A. (2001) *Nat Genet* **28**, 216-217

18. Gasca, S., Canizares, J., De Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11199-11204
19. Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., and Wegner, M. (1998) *J Neurosci* **18**, 237-250
20. Southard-Smith, E. M., Kos, L., and Pavan, W. J. (1998) *Nat Genet* **18**, 60-64
21. Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., and de Crombrughe, B. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 2336-2346
22. Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S., and Koopman, P. (1997) *Dev Biol* **183**, 108-121
23. Bell, D. M., Leung, K. K., Wheatley, S. C., Ng, L. J., Zhou, S., Ling, K. W., Sham, M. H., Koopman, P., Tam, P. P., and Cheah, K. S. (1997) *Nat Genet* **16**, 174-178
24. Harley, V. R., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N., and Hextall, P. J. (1996) *FEBS Lett* **391**, 24-28
25. Mertin, S., McDowall, S. G., and Harley, V. R. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**, 1359-1364
26. Lefebvre, V., Li, P., and de Crombrughe, B. (1998) *EMBO J* **17**, 5718-5733
27. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (1999) *Nat Genet* **22**, 85-89
28. Bernard, P., Tang, P., Liu, S., Dewing, P., Harley, V. R., and Vilain, E. (2003) *Hum Mol Genet* **12**, 1755-1765
29. Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kowk, G., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., and *et al.*, (1994) *Nature* **372**, 525-530
30. Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., and *et al.*, (1994) *Cell* **79**, 1111-1120
31. Kwok, C., Weller, P. A., Guioli, S., Foster, J. W., Mansour, S., Zuffardi, O., Punnett, H. H., Dominguez-Steglich, M. A., Brook, J. D., Young, I. D., and *et al.*, (1995) *Am J Hum Genet* **57**, 1028-1036
32. Zhang, P., Jimenez, S. A., and Stokes, D. G. (2003) *J Biol Chem* **278**, 117-123
33. Bridgewater, L. C., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. (1998) *J Biol Chem* **273**, 14998-15006
34. Bridgewater, L. C., Walker, M. D., Miller, G. C., Ellison, T. A., Holsinger, L. D., Potter, J. L., Jackson, T. L., Chen, R. K., Winkel, V. L., Zhang, Z., McKinney, S., and de Crombrughe, B. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**, 1541-1553
35. Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., and Noda, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 10738-10744
36. Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., and Ikawa, Y. (1990) *Cell Differ Dev* **30**, 109-116
37. Shukunami, C., Ishizeki, K., Atsumi, T., Ohta, Y., Suzuki, F., and Hiraki, Y. (1997) *J Bone Miner Res* **12**, 1174-1188
38. Langlois, M. F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J. D., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 24927-24933
39. McDonald, P. P., Fadok, V. A., Bratton, D., and Henson, P. M. (1999) *J Immunol* **163**, 6164-6172
40. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-1489

41. Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L., and Dubois, C. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33986-33994
42. Akiyama, H., Shukunami, C., Nakamura, T., and Hiraki, Y. (2000) *Cell Struct Funct* **25**, 195-204
43. Ayoubi, T. A., Creemers, J. W., Roebroek, A. J., and Van de Ven, W. J. (1994) *J Biol Chem* **269**, 9298-9303
44. Lefebvre, V., Zhou, G., Mukhopadhyay, K., Smith, C. N., Zhang, Z., Eberspaecher, H., Zhou, X., Sinha, S., Maity, S. N., and de Crombrughe, B. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4512-4523
45. Ambrosetti, D. C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 6321-6329
46. Sock, E., Pagon, R. A., Keymolen, K., Lissens, W., Wegner, M., and Scherer, G. (2003) *Hum Mol Genet* **12**, 1439-1447
47. De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 6653-6665
48. Kamachi, Y., Cheah, K. S., and Kondoh, H. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 107-120
49. Kou, I., and Ikegawa, S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 50942-50948
50. Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U. I. (2004) *Arthritis Rheum* **50**, 3561-3573
51. Hsiao, N. W., Samuel, D., Liu, Y. N., Chen, L. C., Yang, T. Y., Jayaraman, G., and Lyu, P. C. (2003) *Biochemistry* **42**, 11183-11193
52. Laprise, M. H., Grondin, F., Cayer, P., McDonald, P. P., and Dubois, C. M. (2002) *Blood* **100**, 3578-3587
53. McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P. P., Richard, D. E., and Dubois, C. M. (2005) *J Biol Chem* **280**, 6561-6569
54. Alam, T., and Sollinger, H. W. (2002) *Transplantation* **74**, 1781-1787
55. Weiss, M. A. (2001) *Mol Endocrinol* **15**, 353-362
56. Peirano, R. I., and Wegner, M. (2000) *Nucleic Acids Res* **28**, 3047-3055
57. Rentsendorj, O., Nagy, A., Sinko, I., Daraba, A., Barta, E., and Kiss, I. (2005) *Biochem J* **389**, 705-716
58. Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., and Lefebvre, V. (2001) *Dev Cell* **1**, 277-290
59. Murphy, C. L., and Polak, J. M. (2004) *J Cell Physiol* **199**, 451-459
60. Wilson, M. J., Jeyasuria, P., Parker, K. L., and Koopman, P. (2005) *J Biol Chem* **280**, 5917-5923
61. Nakayama, K., Kim, W. S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., and Murakami, K. (1992) *J Biol Chem* **267**, 5897-5900
62. Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N. G., Bennett, H. P., and Hendy, G. N. (1998) *J Biol Chem* **273**, 8572-8580
63. Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., and Christian, J. L. (2001) *Genes Dev* **15**, 2797-2802
64. Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M. H., and Dubois, C. M. (1997) *J Clin Invest* **99**, 1974-1983
65. Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., and Yoshikawa, H. (2002) *J Bone Miner Res* **17**, 898-906
66. Hatakeyama, Y., Tuan, R. S., and Shum, L. (2004) *J Cell Biochem* **91**, 1204-1217

67. Weir, E. C., Philbrick, W. M., Amling, M., Neff, L. A., Baron, R., and Broadus, A. E. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10240-10245

### 3. DISCUSSION

L'ostéoarthrite est la maladie la plus commune des articulations. Aux États-Unis, on estime que 16 millions de personnes en sont atteintes. Associé au vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes ne peut qu'augmenter et les coûts engendrés par l'ostéoarthrite risquent de devenir très importants. Malgré les nombreux efforts de recherche dont cette pathologie fait l'objet, aucun traitement curatif n'est encore disponible. De plus, l'étiologie même de la maladie demeure toujours inconnue.

Des études récentes ont mené certains auteurs à émettre l'hypothèse que l'ostéoarthrite serait causée par une perte de fonctions des chondrocytes articulaires. Les chondrocytes articulaires sont normalement dans un état qualifié de dormance. Au fait, il est généralement accepté que les chondrocytes articulaires sont des cellules ayant fait un «arrêt sur image» à un moment précis, lors de leur différenciation. Cet état de différenciation bien précis leur permet d'exprimer un éventail de gènes de telle sorte que ces cellules sont alors en mesure de former un cartilage articulaire et de le maintenir fonctionnel. Les chondrocytes qui ne sont pas destinés à devenir des chondrocytes articulaires poursuivent leur différenciation (ossification endochondrale) dans le but ultime de former une matrice osseuse, puis un squelette.

Plusieurs molécules et facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de l'ossification endochondrale. BMP-4, TGF- $\beta$  et PTHrP sont, en plus d'être maturés par la furine, trois joueurs importants dans cette régulation. À partir de ces

informations, nous voulions vérifier le patron d'expression de la furine dans un modèle cellulaire de différenciation chondrocytaire.

En tant que modèle expérimental, nous avons opté pour la lignée cellulaire chondrocytaire murine ATDC5. Ces cellules ont la particularité qu'une fois mises en présence d'insuline, elles reproduisent de façon ordonnée les différentes étapes de la chondrogenèse. Nous avons donc procédé à différents essais de différenciation avec les cellules ATDC5. Lors de ces essais, l'ARN total a été extrait de cultures à différents intervalles de temps de façon à nous permettre de déterminer, dans un premier temps, s'il y avait différenciation puis dans un deuxième, d'identifier les différentes étapes franchies. Les résultats obtenus de l'analyse par RT-PCR de l'ARN extrait nous permettent d'affirmer que lors de nos essais, les cellules ATDC5 subissent un processus de différenciation et passent effectivement par les différentes étapes caractéristiques de l'ossification endochondrale. En effet, l'analyse de l'expression du collagène de type II et X, deux gènes utilisés comme marqueur de différenciation, démontrent que ceux-ci subissent des modulations d'expression similaire à celles rapportées dans la littérature (SHUKUNAMI *et al.*, 1997 ; AKIYAMA *et al.*, 2000).

L'expression coordonnée de ces gènes nous permet d'identifier les étapes de différenciation atteintes par les cellules ATDC5 selon le temps de culture. Ainsi, nous pouvons déterminer que l'étape de prolifération débute au jour 0 et se termine de façon typique au jour 5, soit lorsque les cellules atteignent le niveau de

confluence. L'étape de condensation débute à la confluence cellulaire et se caractérise par le début d'expression du collagène de type II. C'est lors de cette étape, soit entre les 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de culture, que l'on peut observer le début de formation de nodules cartilagineux. L'étape de préhypertrophie débute vers le jour 21 au moment où l'expression du collagène de type II diminue pour éventuellement être remplacé par le collagène de type X. On croit que c'est à cette étape que les chondrocytes articulaires arrêteraient leur processus de différenciation. L'éventail de gènes exprimés au stade préhypertrophique permettrait la formation de cartilage répondant aux propriétés nécessaires aux fonctions caractéristiques du cartilage articulaire, soit la résistance à la pression et à la friction. L'expression du collagène de type X marque le début de l'étape d'hypertrophie. Ce dernier change les propriétés du cartilage formé subséquemment et amorce le processus de minéralisation qui mènera à la formation des os. Dans notre modèle expérimental, le patron d'expression des différents gènes ainsi que la détermination des différentes étapes selon le temps de culture sont en accord avec la littérature. En effet, l'expression en fonction du temps des marqueurs de différenciation utilisés, soit le collagène de type II et X, va de pair avec les études utilisant le même modèle de différenciation validant ainsi le modèle expérimental (MUSHTAQ *et al.*, 2002; AKIYAMA *et al.*, 2000; SHUKUNAMI *et al.*, 1997).

Dans notre étude, nous démontrons pour la première fois, que le gène de la furine est modulé selon la différenciation de la lignée chondrocytaire ATDC5. Ce résultat a été obtenu de l'analyse par RT-PCR et confirmé par essais de PCR en temps réel. Les



résultats obtenus par ces deux technologies nous indiquent que l'expression du gène de la furine est parallèle à celle du collagène de type II et du facteur de transcription Sox9. L'expression de la furine augmente de façon significative à l'étape de condensation, suggérant un rôle de celle-ci à cette étape et possiblement à l'étape de préhypertrophie. Il est intéressant de noter que l'expression de la furine va de pair avec la disponibilité temporelle de deux substrats importants dans la transition des phases préhypertrophique à hypertrophique, soit le PTHrP et BMP-4.

Nous avons entrepris d'identifier le ou les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de la furine chez les chondrocytes. Suite aux résultats obtenus lors des essais de différenciation avec la lignée cellulaire ATDC5, soit une expression parallèle de la furine et de Sox9, le premier candidat fut le Sox9, un facteur de transcription reconnu pour jouer un rôle de premier plan chez les chondrocytes lors de la formation des os.

Afin d'investiguer l'implication de Sox9 dans la régulation du gène de la furine, nous avons tout d'abord testé la surexpression de Sox9 chez les cellules HepG2. Cette lignée cellulaire a été choisie pour trois raisons. Premièrement, ces cellules expriment le facteur de transcription Sox9 de façon endogène, assumant ainsi que la machinerie transcriptionnelle nécessaire à Sox9 est présente. Deuxièmement, contrairement aux autres lignées chondrocytaires, les cellules HepG2 n'expriment pas les facteurs de transcription L-Sox5 et Sox6. Ceci permet d'éviter les effets indésirables entre les différents membres de cette famille. Troisièmement, il s'agit d'une lignée cellulaire

utilisée de façon routinière dans le laboratoire. Les essais de PCR en temps réel nous indiquent que Sox9 active de plus de 4.3 fois les niveaux d'ARNm de la furine. Nous avons aussi déterminé lequel des trois promoteurs de la furine était impliqué dans l'effet observé. Les résultats des essais luciférase effectués nous indiquent que parmi les trois promoteurs de la furine, soit P1, P1A et P1B, le promoteur P1A est le seul à être activé par Sox9 avec une augmentation de son activité basale de 4.9 fois. Ces résultats nous suggèrent que Sox9 a une action positive sur l'expression du gène de la furine via le promoteur P1A. À notre connaissance, c'est la première étude rapportant une régulation du promoteur P1A de la furine. Ce résultat est surprenant puisque suite aux différentes études effectuées au laboratoire, nous nous attendions à une activation préférentielle du promoteur P1. Ce dernier est reconnu pour être régulable grâce à la présence d'éléments de régulation TATA et CCAAT qui se situent dans la séquence proximale du promoteur. D'autre part, les promoteurs P1A et P1B correspondent à des promoteurs de type constitutifs qui se caractérisent par de multiples sites de liaison SP1 et une capacité de régulation limitée. Ceci dit, la régulation du promoteur P1A par Sox9 est en accord avec son rôle développemental. Sox9 est connu pour être important dans l'activation de gènes impliqués dans les événements liés au développement, incluant la détermination du sexe mâle et la formation du squelette.

L'activité du promoteur du collagène de type II est reconnue pour être étroitement liée à la présence de Sox9. Les études de Lefebvre *et al.* ont démontré que la présence de Sox9 était essentielle pour l'expression du gène du collagène de type II

(LEFEBVRE *et al.*, 1997). Pour nous permettre de relativiser le niveau d'activation du promoteur P1A de la furine par Sox9, nous avons, dans un premier temps, comparé la réponse du promoteur P1A en entier avec une portion du promoteur du collagène de type II contenant un élément de réponse à Sox9 puis, dans un deuxième temps, avec un promoteur synthétique contenant cet élément de réponse répété quatre fois. Nous avons démontré que l'activation du promoteur de la furine était supérieure à celle de l'élément de réponse du collagène de type II et comparable à l'élément de réponse répété quatre fois. Les essais effectués nous permettent d'avancer que le promoteur P1A de la furine est activé à des niveaux semblables à ceux du promoteur du collagène de type II.

Notre étude de délétion en 5' du promoteur P1A nous a permis de déterminer que la région -2096/-1563 était nécessaire à la réponse à Sox9. De plus, nous avons mis en évidence la présence de deux séquences consensus Sox dans cette région du promoteur. Des essais luciférase ont été effectués avec différents mutants ponctuels de façon à déterminer l'importance relative de chacun des deux sites dans l'activation du promoteur P1A par Sox9. Les résultats ont démontré deux faits intéressants. Premièrement, pour obtenir une activation maximale du promoteur P1A, les deux séquences consensus Sox doivent être intactes. L'inactivation d'un des deux sites résulte en une baisse importante de l'activation observée par Sox9, suggérant que celui-ci agit sous forme de dimère. Deuxièmement, une des séquences consensus Sox identifiées aurait un rôle plus important dans cette régulation. L'inactivation de site B inhibe complètement l'effet activateur de Sox9 alors que l'inactivation du site A ne

réduit que partiellement l'activité du promoteur P1A. Il semble donc évident que les deux séquences consensus Sox identifiées dans la région -2096/-1563 du promoteur P1A de la furine sont nécessaires à son activation complète. Cette observation n'est pas unique au promoteur de la furine et des critères d'organisation précis des sites de reconnaissance Sox en vue de la formation de dimères ont été développés. Ainsi, la position de ces sites de reconnaissance Sox l'un par rapport à l'autre est compatible avec les exigences nécessaires à la formation de dimères de Sox9. En effet, les sites Sox9 fonctionnels du promoteur P1A de la furine sont orientés de façon à se faire face l'un par rapport à l'autre et ils sont séparés par 4 nucléotides (BRIDGEWATER *et al.*, 2003).

La capacité de Sox9 à former des dimères a été reconnue grâce à l'identification d'un patient possédant une mutation dans le domaine de dimérisation de cette protéine. (BERNARD *et al.*, 2003 ; SOCK *et al.*, 2003). Ce patient souffrait de dysplasie campomélique mais, contrairement aux patients jusqu'ici répertoriés et atteints par cette maladie, il n'avait aucun symptôme de réversion de sexe. Dans cette étude, les auteurs ont démontré de façon élégante que le mutant Sox9 conservait sa capacité à transactiver les gènes associés au phénotype sexuel au détriment de ceux associés à la chondrogenèse (BERNARD *et al.*, 2003). Plusieurs études tendent à démontrer que la dimérisation de Sox9 est impliquée dans la régulation de gènes participant au développement du squelette, dont les collagènes de type II (SOCK *et al.*, 2003), de type IX (BERNARD *et al.*, 2003), de type XI (SOCK *et al.*, 2003; BERNARD *et al.*, 2003; BRIDGEWATER *et al.*, 2003) ainsi que CD-RAP (SOCK *et al.*, 2003). Le

second rôle de Sox9, soit la détermination du sexe mâle, serait quant à lui joué par la version monomérique de Sox9, tel que démontré dans les cas du SF1 (steroidogenic factor 1) (BERNARD *et al.*, 2003) et du AMH (SOCK *et al.*, 2003). La participation des monomères et dimères de Sox9 dans la régulation du collagène de type II est plus ambiguë. Selon l'étude de SOCK *et al.* (2003) Sox9 s'associerait aux multiples sites de liaison Sox présents dans la séquence de son promoteur si bien que 4 complexes correspondant aux 4 sites de liaisons consensus peuvent être détectés par essai de gel de rétention. Deux des quatre sites heptamériques répondent aux critères permettant la formation de dimères alors que les deux autres ne permettent que la liaison du facteur de transcription monomérique.

Les essais de gels de rétention (EMSA) effectués nous ont fourni de précieux renseignements sur le type de relation existant entre l'ADN contenant les sites de reconnaissance Sox et la protéine Sox9. Les résultats obtenus avec un oligonucléotide contenant les deux sites de liaisons consensus Sox9 du promoteur P1A de la furine nous indiquent que Sox9 forme un lien direct avec les sites consensus identifiés dans la région -2096/-1563 du promoteur. Sox9 lie ces deux sites en tant que dimère, et la mutation d'un des deux sites inhibe la formation de ce dimère. Puisque seule l'action du dimère de Sox9 permet l'activation complète du promoteur P1A, ceci suggère donc un rôle de la furine dans le processus de formation des os (BERNARD *et al.*, 2003; BRIDGEWATER *et al.*, 2003; SOCK *et al.*, 2003).

Il nous est maintenant possible d'élaborer un modèle de la liaison de Sox9 au promoteur P1A de la furine. Selon nos résultats, il y aurait dans un premier temps, liaison d'une molécule de Sox9 au site B. Ce site possède possiblement une plus haute affinité pour la protéine Sox9 que le site A. Il a été démontré par MERTIN *et al.* (1999) qu'en plus de la séquence consensus reconnue par les membres de la famille Sox, certaines protéines de cette famille ont une affinité plus grande pour certaines séquences d'ADN. Selon les auteurs, les nucléotides en 5' et en 3' influenceraient l'affinité de reconnaissance. Ainsi, la liaison de Sox9 favoriserait une séquence précédée de AG (ou TC) en 5' et qui se terminerait par GG (ou CC) en 3'. Ces éléments supportent nos observations, car la séquences de liaison au site B correspond à cette situation. Dans un deuxième temps, il y aurait formation d'un dimère due à la liaison d'une deuxième molécule Sox9 au site A. À elle seule, la première étape a la capacité d'activer le promoteur P1A mais l'activation maximale n'est obtenue que par la formation de dimères.

Les résultats de gels de rétention nous révèlent la présence d'un complexe d'une masse moléculaire supérieure à celui correspondant au duplexe de Sox9. Il est possible que ce complexe soit formé par un dimère de Sox9 en association à une protéine non identifiée. Dans la littérature, quelques groupes de recherche ont rapporté la présence de protéines formant un complexe avec le facteur de transcription Sox9. C'est le cas lors de l'activation du gène du collagène de type II. Une protéine toujours non identifiée, nommée COL2C2, a la capacité de former un lien protéine-protéine avec Sox9 menant à l'activation du gène du collagène de type

II (KAMACHI *et al.*, 1999; KAMACHI *et al.*, 2000). Un autre facteur de transcription, SF1, forme lui aussi un lien direct avec Sox9, mais cette fois lors de l'activation du gène de l'hormone anti-Müllerian (AMH) qui est impliquée dans la détermination du sexe mâle (DE SANTA BARBARA *et al.*, 1998; KAMACHI *et al.*, 2000). Dans les deux cas, les auteurs ont démontré que la présence des protéines partenaires de Sox9 est essentielle à une activation maximale des gènes cibles.

Sox9 n'est pas le seul membre de la famille des facteurs de transcription Sox à former un complexe avec d'autres protéines lors de l'activation de gènes. C'est aussi le cas lors de l'activation du fibroblast growth factor 4 (FGF-4) par Sox2 en synergie avec la protéine Oct-3 (AMBROSETTI *et al.*, 1997). Dans leur étude, les auteurs ont démontré que ces deux protéines s'associaient au promoteur du FGF-4 et qu'une interaction directe entre Sox2 et Oct-3 était nécessaire pour une activation maximale. Une deuxième protéine forme un complexe spécifique avec Sox2 lors de l'activation du gène  $\delta$ -cristallin chez le poulet (KAMACHI *et al.*, 1995). En effet, la protéine  $\delta$ EF3 s'associerait physiquement au motif HMG de Sox2 de façon à augmenter l'affinité de cette dernière pour l'ADN. Ces observations sont à la base de l'hypothèse selon laquelle les Sox exerceraient une sélection des gènes cibles via l'entremise de protéines spécifiques à ces derniers. Jusqu'à maintenant, dans tous les cas sauf un, l'expression de ces protéines partenaires s'est avérée limitée aux organes ou tissus correspondant aux gènes activés (KAMACHI *et al.*, 2000). L'exception concerne la protéine COL2C2 qui semble être exprimée dans un grand nombre de tissus (BI *et al.*, 1999).

Malgré une importance dans le processus de chondrogenèse, le rôle moléculaire précis des facteurs de transcription L-Sox5 et Sox6 demeure inconnu. Certains auteurs avancent que ces deux protéines joueraient un rôle dans le mécanisme de transcription en réorganisant la structure de l'ADN (LEFEBVRE, 2002). Le gène Col2a1 est le seul pour lequel des résultats *in vivo* et *in vitro* sont disponibles. L-Sox5 et Sox6 agiraient chez les chondroblastes de façon à augmenter l'expression des gènes activés par Sox9. Sox5 et Sox6 auraient donc un rôle de coopération avec Sox9. Cela dit, le mécanisme sous-jacent demeure spéculatif. Des études récentes ont suggéré que Sox5 et 6 agissent en tant que répresseurs de la transcription de certains gènes. MURAKAMI *et al.* (2001) ont démontré que Sox6 réprimait l'activité du promoteur du gène *Fgf-3* lors d'essais de transfections transitoires en se liant à des éléments de régulation. ZHANG *et al.* (2003) ont également observé un effet de répression dans le cas du gène Col9a1 lors d'essai de transfections transitoires en co-exprimant L-Sox5, Sox6 et Sox9.

Nos résultats supportent un rôle répresseur de L-Sox5 et Sox6. En effet, ces derniers régulent à la baisse de façon significative l'activité du promoteur P1A de la furine induite par Sox9. Par contre, nos résultats ne démontrent pas un mode d'action coopératif entre L-Sox5 et Sox6. Aucun effet de coopération n'est observé lorsque ces deux protéines sont co-transfectées.



Par contre, un élément de réponse intéressant, pouvant mener à l'explication de l'effet répresseur de L-Sox5 et Sox6, a été obtenu dans notre étude lors de l'utilisation de mutants avec différentes affinités pour l'ADN (HSIAO *et al.*, 2003). Des trois versions de la protéine Sox6 utilisées, l'une correspondait au type sauvage dont on avait assigné une affinité arbitraire de 100%. Les deux autres variants ont été mutés de façon à obtenir une affinité pour l'ADN modérée (44.5%) et faible (1.8%). Seuls les sites HMG de ces mutants ont été modifiés permettant ainsi de ne pas affecter la structure finale ainsi que la stabilité des protéines. Les résultats des essais effectués avec ces mutants nous démontrent qu'une diminution de l'affinité pour l'ADN de Sox6 diminue son effet répressif dans l'activation du promoteur P1A induite par Sox9. Notre observation concernant l'interaction Sox9/Sox6 dans l'activation d'un promoteur est tout à fait nouvelle. Ceci suggère que Sox6, et possiblement L-Sox5, étant donné la haute homologie dans leur séquence HMG, aurait une affinité plus grande que Sox9 pour l'élément de réponse Sox sur le promoteur P1A. La répression observée pourrait donc être expliquée par un phénomène de compétition d'affinité entre les différentes protéines Sox.

Nos résultats concernant l'interaction positive entre Sox5, 6 et 9 concordent avec les connaissances actuelles que nous avons de la famille des Sox. Dans notre modèle, les trois protéines reconnaissent toutes une même séquence de base correspondant à la séquence Sox consensus. Les nucléotides situés en 3' et 5' de cette séquence vont permettre de modifier/spécifier l'affinité des différents Sox (MERTIN *et al.*, 1999). Il est alors possible que Sox6 ait plus d'affinité que Sox9 pour la séquence de liaison

identifiée dans le promoteur P1A de la furine. Remis dans un contexte physiologique, il est connu, surtout pour des facteurs de transcription impliqués dans le processus de développement, que ceux-ci agissent à la fois comme activateur et répresseur. De cette façon, les différents gènes impliqués dans les processus de développement sont activés dans un laps de temps adéquat l'un par rapport à l'autre de façon coordonnée, et ceci, avec un minimum de facteurs de transcription.

## 4. Conclusion

Cette étude avait pour but, dans un premier temps, d'étudier la régulation du gène de la proprotéine convertase furine dans un modèle de chondrogenèse puis, dans un second, de déterminer le ou les facteurs de transcription impliqués. Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé un modèle cellulaire de différenciation chondrocytaire reconnu auquel nous avons joint la technique de RT-PCR. Ceci nous a permis d'accumuler des résultats quant à l'expression de la furine dans un tel processus ainsi que les facteurs de transcription pouvant jouer un rôle dans sa régulation. Nous avons démontré, lors de la différenciation de la lignée cellulaire ATDC5, que la furine était exprimée parallèlement au collagène de type II et que le facteur de transcription Sox9 était responsable de cette expression via l'activation du promoteur P1A. Nous avons également poussé un peu plus loin notre investigation afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués. Ainsi, Sox9 agit de façon dimérique par l'intermédiaire de deux sites de liaison au sein du promoteur P1A de la furine. Finalement, les facteurs de transcription L-Sox5 et Sox6 agissent comme régulateur négatif de l'activité du promoteur P1A de la furine induit par Sox9. Par contre, certains éléments restent à être précisés. Il serait nécessaire de comparer nos résultats avec un autre modèle d'ossification endochondrale. Par exemple, le modèle de réparation de fracture chez la souris permet de récapituler *in vivo* toutes les étapes de ce processus. Il serait aussi intéressant d'explorer les niveaux protéiques des différents acteurs répertoriés dans notre système cellulaire. Finalement, il serait

pertin角度 d'étudier la différenciation de chondrocytes déficient en furine pour déterminer son importance dans ce processus.

Les connaissances recueillies sont très importantes pour l'orientation de projets futurs ayant pour but la mise au point d'une thérapie ayant pour cible les SPCs. Depuis plusieurs années, les recherches sur l'ostéoarthrite ont permis de comprendre de mieux en mieux cette pathologie. Malheureusement, encore aujourd'hui, très peu de thérapies sont disponibles. Il est bien connu que la furine mature un éventail de substrats ayant un rôle primordial dans la formation et le maintien du cartilage articulaire tel que le TGF $\beta$ , le PTHrP et le BMP-4. Il serait plus qu'intéressant de vérifier si une surexpression de la furine peut apporter des changements quant à la progression de la maladie. Les travaux de NAKAJIMA *et al.* (2002) ainsi que ceux de McMAHON *et al.* (2005) ont démontré que la surexpression de la furine pouvait mener à une augmentation de la production de facteurs de croissances matures. Ainsi, il serait donc possible chez un patient atteint d'arthrite, qu'une surexpression de furine puisse jouer un rôle bénéfique afin de contrecarrer le développement de la pathologie au niveau des articulations par le biais d'une thérapie par exemple. Dans un premier temps, il pourrait être avantageux d'augmenter les niveaux d'expression de la convertase afin de bloquer la différenciation des chondrocytes articulaires grâce à l'action du TGF $\beta$  et du PTHrP puis, dans un second temps, de promouvoir la production de cartilage articulaire via l'action du BMP-4. Ceci pourrait être vérifié dans un modèle expérimental d'ostéoarthrite chez le chien. Il serait plus qu'intéressant de vérifier si une surexpression de la furine peut apporter des

changements quant à la progression de la maladie. Cela dit, il faudrait avant tout éclaircir la relation existante entre L-Sox5 et Sox6 ainsi que définir leur rôle dans la régulation du gène de la furine selon l'état (hétéro/homodimère) dans lequel ils sont retrouvés. Il serait aussi important de démontrer hors de tout doute que la répression du gène de la furine causé par Sox6 résulte d'une compétition d'affinité. L'utilisation de diverses concentrations et/ou combinaisons de protéines purifiées dans des études de gels de rétention seront donc nécessaires.

## **5. REMERCIEMENTS**

J'aimerais tout d'abord remercier Claire Dubois pour m'avoir donné la chance de poursuivre ma formation scientifique en plus de m'avoir laissé toute la latitude nécessaire afin de satisfaire ma curiosité.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire, Francine, Sébastien, Martine et Julie pour les belles années passées auprès de vous tous ; pour l'aide, le soutien et les innombrables échanges scientifiques. Sans oublier Stéphanie, pour sa générosité, son soutien, sa présence, sa persévérance contagieuse et son esprit critique, merci.

Merci à tous les professeurs, étudiants ainsi que le personnel de soutien du service d'immunologie pour leur aide inestimable tout au long de ma maîtrise.

## 6. RÉFÉRENCES

Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. *Cell Struct Funct* 2000;25(3):195-204.

Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* 1997;17(11):6321-9.

Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* 1997;17(11):6321-9.

Amling M, Neff L, Tanaka S, *et al.*, Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 1997;136(1):205-13.

Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* 2001;15(10):1837-9.

Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F, Thomas G. Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 1997;16(7):1508-18.

Anglikar H. Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* 1995;38(20):4014-8.

Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(4):401-4.

Ayoubi TA, Creemers JW, Roebroek AJ, Van de Ven WJ. Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem* 1994;269(12):9298-303.

Barr PJ, Mason OB, Landsberg KE, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues. *DNA Cell Biol* 1991;10(5):319-28.

Barrett AJ, Starkey PM. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 1973;133(4):709-24.

Bassi DE, Lopez De Cicco R, Mahloogi H, Zucker S, Thomas G, Klein-Szanto AJ. Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(18):10326-31.

Bassi DE, Mahloogi H, Al-Saleem L, Lopez De Cicco R, Ridge JA, Klein-Szanto AJ. Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* 2001;31(4):22432.

Bathurst IC, Brennan SO, Carrell RW, Cousens LS, Brake AJ, Barr PJ. Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* 1987;235(4786):348-50.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, *et al.*, SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 1997;16(2):174-8.

Benton HP, Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154(1):421-8.

Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, Vilain E. Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* 2003;12(14):1755-65.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999;22(1):85-9.

Blanchette F, Day R, Dong W, Laprise MH, Dubois CM. TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* 1997;99(8):1974-83.

Blomstrand S, Claesson I, Save-Soderbergh J. A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr Radiol* 1985;15(2):141-3.

Bohme K, Winterhalter KH, Bruckner P. Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp Cell Res* 1995;216(1):191-8.

Boudreault A, Gauthier D, Lazure C. Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem* 1998;273(47):31574-80.

Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrughe B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* 1998;273(24):14998-5006.



Bridgewater LC, Walker MD, Miller GC, *et al.*, Adjacent DNA sequences modulate Sox9 transcriptional activation at paired Sox sites in three chondrocyte-specific enhancer elements. *Nucleic Acids Res* 2003;31(5):1541-53.

Bruzzaniti A, Goodge K, Jay P, *et al.*, PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem J* 1996;314 ( Pt 3):727-31. •

Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem Sci* 1998;23(2):59-62.

Cameron A, Appel J, Houghten RA, Lindberg I. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* 2000;275(47):36741-9.

Cawston T, Billington C, Cleaver C, *et al.*, The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:120-9.

Chan SJ, Oliva AA, Jr., LaMendola J, Grens A, Bode H, Steiner DF. Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(15):6678-82.

Chimal-Monroy J, Diaz de Leon L. Differential effects of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 and beta 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int J Dev Biol* 1997;41(1):91-102.

Chretien M, Li CH. Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem* 1967;45(7):1163-74.

Connor F, Cary PD, Read CM, *et al.*, DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res* 1994;22(16):3339-46.

Constam DB, Calfon M, Robertson EJ. SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol* 1996;134(1):181-91.

Creemers JW, Siezen RJ, Roebroek AJ, Ayoubi TA, Huylebroeck D, Van de Ven WJ. Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1993;268(29):21826-34.

Creemers JW, Vey M, Schafer W, *et al.*, Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995;270(6):2695-702.

Cui Y, Hackenmiller R, Berg L, *et al.*, The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* 2001;15(21):2797-802.

Day R, Schafer MK, Cullinan WE, Watson SJ, Chretien M, Seidah NG. Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 1993;149(1):27-30.

De Bie I, Marcinkiewicz M, Malide D, *et al.*, The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol* 1996;135(5):1261-75.

de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(6):721-7.

De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, *et al.*, Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998;18(11):6653-65.

Decroly E, Vandenbranden M, Ruyschaert JM, *et al.*, The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-I TM). *J Biol Chem* 1994;269(16):12240-7.

Denault JB, Lazure C, Day R, Leduc R. Comparative characterization of two forms of recombinant human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein Expr Purif* 2000;19(1):113-24.

Denker AE, Nicoll SB, Tuan RS. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* 1995;59(1):25-34.

Dieudonne SC, Semeins CM, Goei SW, *et al.*, Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. *J Bone Miner Res* 1994;9(6):771-80.

Dong W, Marcinkiewicz M, Vieau D, Chretien M, Seidah NG, Day R. Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J Neurosci* 1995;15(3 Pt 1):1778-96.

Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 1995;270(18):10618-24.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, *et al.*, Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000;275(12):8695-702.

Feldmann H, Volchkov VE, Volchkova VA, Klenk HD. The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. *Arch Virol Suppl* 1999;15:159-69.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 1992;11(12):4497-506.

Flannery CR, Little CB, Caterson B, Hughes CE. Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biol* 1999;18(3):225-37.

Foster DC, Holly RD, Sprecher CA, Walker KM, Kumar AA. Endoproteolytic processing of the human protein C precursor by the yeast Kex2 endopeptidase coexpressed in mammalian cells. *Biochemistry* 1991;30(2):367-72.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, *et al.*, Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;372(6506):525-30.

Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, *et al.*, Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 1999;126(6):1305-15.

Fukumura K, Matsunaga S, Yamamoto T, Nagamine T, Ishidou Y, Sakou T. Immunolocalization of transforming growth factor-beta s and type I and type II receptors in rat articular cartilage. *Anticancer Res* 1998;18(6A):4189-93.

Fuller RS, Brake A, Thorner J. Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(5):1434-8.

Fuller RS, Sterne RE, Thorner J. Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Physiol* 1988;50:345-62.

Garten W, Hallenberger S, Ortmann D, *et al.*, Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* 1994;76(3-4):217-25.

Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, *et al.*, A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(17):11199-204.

Gentry LE, Liubin MN, Purchio AF, Marquardt H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 1988;8(10):4162-8.

Gentry LE, Webb NR, Lim GJ, *et al.*, Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1987;7(10):3418-27.

Gluschankof P, Fuller RS. A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *EMBO J* 1994;13(10):2280-8.

Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7(4):311-25.

Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 1988;82(6):2026-37.

Goodman LJ, Gorman CM. Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201(2):795-804.

Gordon VM, Klimpel KR, Arora N, Henderson MA, Leppla SH. Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun* 1995;63(1):82-7.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, *et al.*, A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990;346(6281):245-50.

Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 1992;360(6402):358-61.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 1994;22(8):1500-1.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, Hextall PJ. The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett* 1996;391(1-2):24-8.

Hatakeyama Y, Tuan RS, Shum L. Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2004;91(6):1204-17.

Hatsuzawa K, Hosaka M, Nakagawa T, *et al.*, Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 1990;265(36):22075-8.

Hatsuzawa K, Murakami K, Nakayama K. Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)* 1992;111(3):296-301.

Hatsuzawa K, Nagahama M, Takahashi S, Takada K, Murakami K, Nakayama K. Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992;267(23):16094-9.

Hendy GN, Bennett HP, Gibbs BF, Lazure C, Day R, Seidah NG. Proparathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J Biol Chem* 1995;270(16):9517-25.

Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, *et al.*, The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 2003;10(7):520-6.

Hiraki Y, Inoue H, Kondo J, *et al.*, A novel growth-promoting factor derived from fetal bovine cartilage, chondromodulin II. Purification and amino acid sequence. *J Biol Chem* 1996;271(37):22657-62.

Hiraki Y, Tanaka H, Inoue H, Kondo J, Kamizono A, Suzuki F. Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175(3):971-7.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10(13):1580-94.

Horner A, Kemp P, Summers C, *et al.*, Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone* 1998;23(2):95-102.

Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, *et al.*, Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 1991;266(19):12127-30.

Hsiao NW, Samuel D, Liu YN, *et al.*, Mutagenesis study on the zebra fish SOX9 high-mobility group: comparison of sequence and non-sequence specific HMG domains. *Biochemistry* 2003;42(38):11183-93.

Hung GL, Galea-Lauri J, Mueller GM, *et al.*, Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther* 1994;1(1):64-9.

Isacson O, Seo H, Lin L, Albeck D, Granholm AC. Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends Neurosci* 2002;25(2):79-84.

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, *et al.*, Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;16(3):303-6.

Jean F, Basak A, DiMaio J, Seidah NG, Lazure C. An internally quenched fluorogenic substrate of prohormone convertase 1 and furin leads to a potent prohormone convertase inhibitor. *Biochem J* 1995;307 ( Pt 3):689-95.

Jean F, Boudreault A, Basak A, Seidah NG, Lazure C. Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270(33):19225-31.

Jones BG, Thomas L, Molloy SS, *et al.*, Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* 1995;14(23):5869-83.

Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990;110(6):2195-207.

Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 1984;37(3):1075-89.

Kabasawa Y, Ejiri S, Matsuki Y, Hara K, Ozawa H. Immunoreactive localization of transforming growth factor-beta type II receptor-positive cells in rat tibiae. *Bone* 1998;22(2):93-8.

Kacprzak MM, Peinado JR, Than ME, *et al.*, Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* 2004;279(35):36788-94.

Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol* 1999;19(1):107-20.

Kamachi Y, Sockanathan S, Liu Q, Breitman M, Lovell-Badge R, Kondoh H. Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J* 1995;14(14):3510-9.

Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000;16(4):182-7.

Karaplis AC, Goltzman D. PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 2000;1(4):331-41.

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, *et al.*, Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 1994;8(3):277-89.

Kibler KV, Miyazato A, Yedavalli VR, *et al.*, Polyarginine inhibits gp160 processing by furin and suppresses productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Biol Chem* 2004.

Kiefer MC, Tucker JE, Joh R, Landsberg KE, Saltman D, Barr PJ. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol* 1991;10(10):757-69.

Kiefer MC, Tucker JE, Joh R, Landsberg KE, Saltman D, Barr PJ. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol* 1991;10(10):757-69.

Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(2):69-78.

Kronenberg HM, Chung U. The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate. *Novartis Found Symp* 2001;232:144-52; discussion 52-7.

Kronenberg HM, Karaplis AC, Lanske B. Role of parathyroid hormone-related protein in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1996;785:119-23.

Kruse K, Schutz C. Calcium metabolism in the Jansen type of metaphyseal dysplasia. *Eur J Pediatr* 1993;152(11):912-5.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 1998;18(1):237-50.

Kulyk WM, Rodgers BJ, Greer K, Kosher RA. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol* 1989;135(2):424-30.

Kwok C, Weller PA, Guioli S, *et al.*, Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1028-36.

Lafeber FP, Vander Kraan PM, Huber-Bruning O, Vanden Berg WB, Bijlsma JW. Osteoarthritic human cartilage is more sensitive to transforming growth factor beta than is normal cartilage. *Br J Rheumatol* 1993;32(4):281-6.

Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF, *et al.*, Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall

arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 1989;143(4):1142-8.

Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993;21(10):2493-501.

Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993;21(10):2493-501.

Lazure C, Gauthier D, Jean F, *et al.*, In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273(15):8572-80.

Leduc R, Molloy SS, Thorne BA, Thomas G. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* 1992;267(20):14304-8.

Lefebvre V. Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab* 2002;20(3):121-30.

Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9 Suppl A:S69-75.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro  $\alpha 1(\text{II})$  collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):2336-46.

Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998;17(19):5718-33.

Lewis JH, Iammarino RM, Spero JA, Hasiba U. Antithrombin Pittsburgh: an  $\alpha 1$ -antitrypsin variant causing hemorrhagic disease. *Blood* 1978;51(1):129-37.

Liu B, Goltzman D, Rabbani SA. Processing of pro-PTHrP by the prohormone convertase, furin: effect on biological activity. *Am J Physiol* 1995;268(5 Pt 1):E832-8.

Lusson J, Benjannet S, Hamelin J, Savaria D, Chretien M, Seidah NG. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J* 1997;326 ( Pt 3):737-44.



Lusson J, Vieau D, Hamelin J, Day R, Chretien M, Seidah NG. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6691-5.

Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 1988;106(5):1659-65.

Macias D, Ganan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros MA, Hurle JM. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 1997;124(6):1109-17.

Malide D, Seidah NG, Chretien M, Bendayan M. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *J Histochem Cytochem* 1995;43(1):11-9.

Mallet WG, Maxfield FR. Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol* 1999;146(2):345-59.

Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chretien M. Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):4922-6.

Marcinkiewicz M, Ramla D, Seidah NG, Chretien M. Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* 1994;135(4):1651-60.

Marshall OJ, Harley VR. Molecular mechanisms of SOX9 action. *Mol Genet Metab* 2000;71(3):455-62.

Marshall OJ, Harley VR. Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Lett* 2001;496(2-3):75-80.

Matthews DJ, Goodman LJ, Gorman CM, Wells JA. A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci* 1994;3(8):1197-205.

Matthews G, Shennan KI, Seal AJ, Taylor NA, Colman A, Docherty K. Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J Biol Chem* 1994;269(1):588-92.

Mbikay M, Sirois F, Yao J, Seidah NG, Chretien M. Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer* 1997;75(10):1509-14.

McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, *et al.*, Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* 1999;274(34):24023-30.

McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 2005;280(8):6561-9.

McMahon S, Laprise MH, Dubois CM. Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res* 2003;291(2):326-39.

Meerabux J, Yaspo ML, Roebroek AJ, Van de Ven WJ, Lister TA, Young BD. A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res* 1996;56(3):448-51.

Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 1999;27(5):1359-64.

Mizuno K, Nakamura T, Ohshima T, Tanaka S, Matsuo H. Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156(1):246-54.

Moldovan F, Pelletier JP, Mineau F, Dupuis M, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Modulation of collagenase 3 in human osteoarthritic cartilage by activation of extracellular transforming growth factor beta: role of furin convertase. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):2100-9.

Molloy SS, Anderson ED, Jean F, Thomas G. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* 1999;9(1):28-35.

Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 1992;267(23):16396-402.

Molloy SS, Thomas L, Kamibayashi C, Mumby MC, Thomas G. Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol* 1998;142(6):1399-411.

Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 1994;13(1):18-33.

- Murakami A, Ishida S, Thurlow J, Revest JM, Dickson C. SOX6 binds CtBP2 to repress transcription from the Fgf-3 promoter. *Nucleic Acids Res* 2001;29(16):3347-55.
- Mushtaq T, Farquharson C, Seawright E, Ahmed SF. Glucocorticoid effects on chondrogenesis, differentiation and apoptosis in the murine ATDC5 chondrocyte cell line. *J Endocrinol* 2002;175(3):705-13.
- Nagamune H, Muramatsu K, Akamatsu T, *et al.*, Distribution of the Kexin family proteases in pancreatic islets: PACE4C is specifically expressed in B cells of pancreatic islets. *Endocrinology* 1995;136(1):357-60.
- Nakagawa T, Hosaka M, Torii S, Watanabe T, Murakami K, Nakayama K. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)* 1993;113(2):132-5.
- Nakagawa T, Murakami K, Nakayama K. Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett* 1993;327(2):165-71.
- Nakayama K, Kim WS, Torii S, *et al.*, Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem* 1992;267(9):5897-900.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, *et al.*, SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1997;183(1):108-21.
- Ortmann D, Ohuchi M, Angliker H, Shaw E, Garten W, Klenk HD. Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J Virol* 1994;68(4):2772-6.
- Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 1983;309(12):694-8.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol Suppl* 1989;18:19-27.
- Peters R, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Donahoe PK, Weiss MA. An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structure-specific DNA recognition: application to the four-way DNA junction. *Biochemistry* 1995;34(14):4569-76.

Pevny LH, Lovell-Badge R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7(3):338-44.

Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 1994;13(24):6115-24.

Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1994;269(23):15957-60.

Poulat F, Barbara PS, Desclozeaux M, *et al.*, The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 1997;272(11):7167-72.

Pujol JP, Loyau G. Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci* 1987;41(10):1187-98.

Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, *et al.*, The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 2000;191(1):9-22.

Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, *et al.*, The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998;392(6672):186-90.

Roebroek AJ, Creemers JW, Pauli IG, *et al.*, Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J Biol Chem* 1992;267(24):17208-15.

Roebroek AJ, Schalken JA, Bussemakers MJ, *et al.*, Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol Biol Rep* 1986;11(2):117-25.

Roebroek AJ, Schalken JA, Leunissen JA, Onnekink C, Bloemers HP, Van de Ven WJ. Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* 1986;5(9):2197-202.

Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 1999;13(11):1361-6.

Salminen H, Vuorio E, Saamanen AM. Expression of Sox9 and type IIA procollagen during attempted repair of articular cartilage damage in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(4):947-55.

Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(12):7599-603.

Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989;109(1):309-15.

Schafer MK, Day R, Cullinan WE, Chretien M, Seidah NG, Watson SJ. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J Neurosci* 1993;13(3):1258-79.

Schafer W, Stroh A, Berghofer S, *et al.*, Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 1995;14(11):2424-35.

Schalken JA, Roebroek AJ, Oomen PP, *et al.*, fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest* 1987;80(6):1545-9.

Schipani E, Kruse K, Juppner H. A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 1995;268(5207):98-100.

Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, *et al.*, Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med* 1996;335(10):708-14.

Schipani E, Provot S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69(4):352-62.

Seidah NG, Chretien M. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1997;8(5):602-7.

Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 1999;848(1-2):45-62.

Seidah NG, Chretien M, Day R. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 1994;76(3-4):197-209.

Seidah NG, Day R, Hamelin J, Gaspar A, Collard MW, Chretien M. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol* 1992;6(10):1559-70.

Seidah NG, Gaspar L, Mion P, Marcinkiewicz M, Mbikay M, Chretien M. cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 1990;9(6):415-24.

Seidah NG, Hamelin J, Mamarbachi M, *et al.*, cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(8):3388-93.

Seidah NG, Marcinkiewicz M, Benjannet S, *et al.*, Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 1991;5(1):111-22.

Seidah NG, Mattei MG, Gaspar L, Benjannet S, Mbikay M, Chretien M. Chromosomal assignments of the genes for neuroendocrine convertase PC1 (NEC1) to human 5q15-21, neuroendocrine convertase PC2 (NEC2) to human 20p11.1-11.2, and furin (mouse 7[D1-E2] region). *Genomics* 1991;11(1):103-7.

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, *et al.*, SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 2000;275(15):10738-44.

Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(7):4397-402.

Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, *et al.*, Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 1997;139(2):541-52.

Shapiro J, Sciaky N, Lee J, Bosshart H, Angeletti RH, Bonifacino JS. Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem* 1997;45(1):3-12.

Shukunami C, Akiyama H, Nakamura T, Hiraki Y. Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *FEBS Lett* 2000;469(1):83-7.

Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* 1997;12(8):1174-88.

Shum L, Nuckolls G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res* 2002;4(2):94-106.

Siezen RJ, Creemers JW, Van de Ven WJ. Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur J Biochem* 1994;222(2):255-66.

Siezen RJ, de Vos WM, Leunissen JA, Dijkstra BW. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng* 1991;4(7):719-37.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, *et al.*, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346(6281):240-4.

Smeekens SP, Avruch AS, LaMendola J, Chan SJ, Steiner DF. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(2):340-4.

Smeekens SP, Steiner DF. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* 1990;265(6):2997-3000.

Smits P, Li P, Mandel J, *et al.*, The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 2001;1(2):277-90.

Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G. Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet* 2003;12(12):1439-47.

Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, *et al.*, Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *Int J Cancer* 2002;98(1):23-8.

Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 1998;18(1):60-4.

Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 1967;157(789):697-700.

Stroh A, Schafer W, Berghofer S, *et al.*, A mono phenylalanine-based motif (F790) and a leucine-dependent motif (LI760) mediate internalization of furin. *Eur J Cell Biol* 1999;78(3):151-60.

Sudbeck P, Scherer G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 1997;272(44):27848-52.

Sudbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 1996;13(2):230-2.

Suzuki F. Roles of cartilage matrix proteins, chondromodulin-I and -II, in endochondral bone formation: a review. *Connect Tissue Res* 1996;35(1-4):303-7.

Takahashi S, Kasai K, Hatsuzawa K, *et al.*, A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195(2):1019-26.

Takahashi S, Nakagawa T, Banno T, Watanabe T, Murakami K, Nakayama K. Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1995;270(47):28397-401.

Takahashi S, Nakagawa T, Kasai K, *et al.*, A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J Biol Chem* 1995;270(44):26565-9.

Takamatsu N, Kanda H, Tsuchiya I, *et al.*, A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol Cell Biol* 1995;15(7):3759-66.

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 2001;15(4):467-81.

Teuchert M, Berghofer S, Klenk HD, Garten W. Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J Biol Chem* 1999;274(51):36781-9.

Thomas G, Thorne BA, Thomas L, *et al.*, Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 1988;241(4862):226-30.

Torii S, Yamagishi T, Murakami K, Nakayama K. Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. *FEBS Lett* 1993;316(1):12-6.

Trimmer EE, Zamble DB, Lippard SJ, Essigmann JM. Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* 1998;37(1):352-62.

Tschan T, Bohme K, Conscience-Egli M, Zenke G, Winterhalter KH, Bruckner P. Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J Biol Chem* 1993;268(7):5156-61.



Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H. Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 2003;278(29):27224-9.

Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, *et al.*, Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res* 2002;17(5):898-906.

Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, *et al.*, Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 2001;153(1):87-100.

Uusitalo H, Hiltunen A, Ahonen M, *et al.*, Accelerated up-regulation of L-Sox5, Sox6, and Sox9 by BMP-2 gene transfer during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16(10):1837-45.

van den Ouweland AM, van Duijnhoven HL, Keizer GD, Dorssers LC, Van de Ven WJ. Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res* 1990;18(3):664.

van Houte LP, Chuprina VP, van der Wetering M, Boelens R, Kaptein R, Clevers H. Solution structure of the sequence-specific HMG box of the lymphocyte transcriptional activator Sox-4. *J Biol Chem* 1995;270(51):30516-24.

Van Rompaey L, Ayoubi T, Van De Ven W, Marynen P. Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proproteins by an engineered alpha 2-macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J* 1997;326 ( Pt 2):507-14.

Vey M, Schafer W, Reis B, *et al.*, Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 1995;206(1):746-9.

Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001;28(3):216-7.

Vindrola O, Mayer AM, Citera G, Spitzer JA, Espinoza LR. Prohormone convertases PC2 and PC3 in rat neutrophils and macrophages. Parallel changes with proenkephalin-derived peptides induced by LPS in vivo. *Neuropeptides* 1994;27(4):235-44.

Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA, Klenk HD. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(10):5762-7.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273(5275):613-22.

Vriz S, Griffiths BL, Harley V, Goodfellow P, Lovell-Badge R. The SRY protein, like HMG 1, recognizes (CA)<sub>n</sub> sequences, an abundant repeat sequence in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37(6):1137-46.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, *et al.*, Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994;79(6):1111-20.

Walter J, Kaether C, Steiner H, Haass C. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(5):585-90.

Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 2000;275(8):5626-32.

Webster MK, Donoghue DJ. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet* 1997;13(5):178-82.

Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 1999;27(6):1409-20.

Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10240-5.

Weiss MA. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol* 2001;15(3):353-62.

Werner MH, Burley SK. Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA. *Cell* 1997;88(6):733-6.

Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 1995;81(5):705-14.

Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995;9(17):2105-16.

Wolffe AP. Architectural transcription factors. *Science* 1994;264(5162):1100-1.

Wouters S, Leruth M, Decroly E, *et al.*, Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem J* 1998;336 ( Pt 2):311-6.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, *et al.*, Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242(4885):1528-34.

Yamashita A, Suzuki S, Fujitani K, *et al.*, cDNA cloning of a novel rainbow trout SRY-type HMG box protein, rtSox23, and its functional analysis. *Gene* 1998;209(1-2):193-200.

Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 2001;153(1):35-46.

Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2002;8(7):340-5.

Zhang P, Jimenez SA, Stokes DG. Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem* 2003;278(1):117-23.

Zheng M, Seidah NG, Pintar JE. The developmental expression in the rat CNS and peripheral tissues of proteases PC5 and PACE4 mRNAs: comparison with other proprotein processing enzymes. *Dev Biol* 1997;181(2):268-83.

Zheng M, Streck RD, Scott RE, Seidah NG, Pintar JE. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J Neurosci* 1994;14(8):4656-73.

Zhong M, Benjannet S, Lazure C, Munzer S, Seidah NG. Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Lett* 1996;396(1):31-6.

Zhou A, Paquet L, Mains RE. Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* 1995;270(37):21509-16.

Zou H, Wieser R, Massague J, Niswander L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 1997;11(17):2191-203.